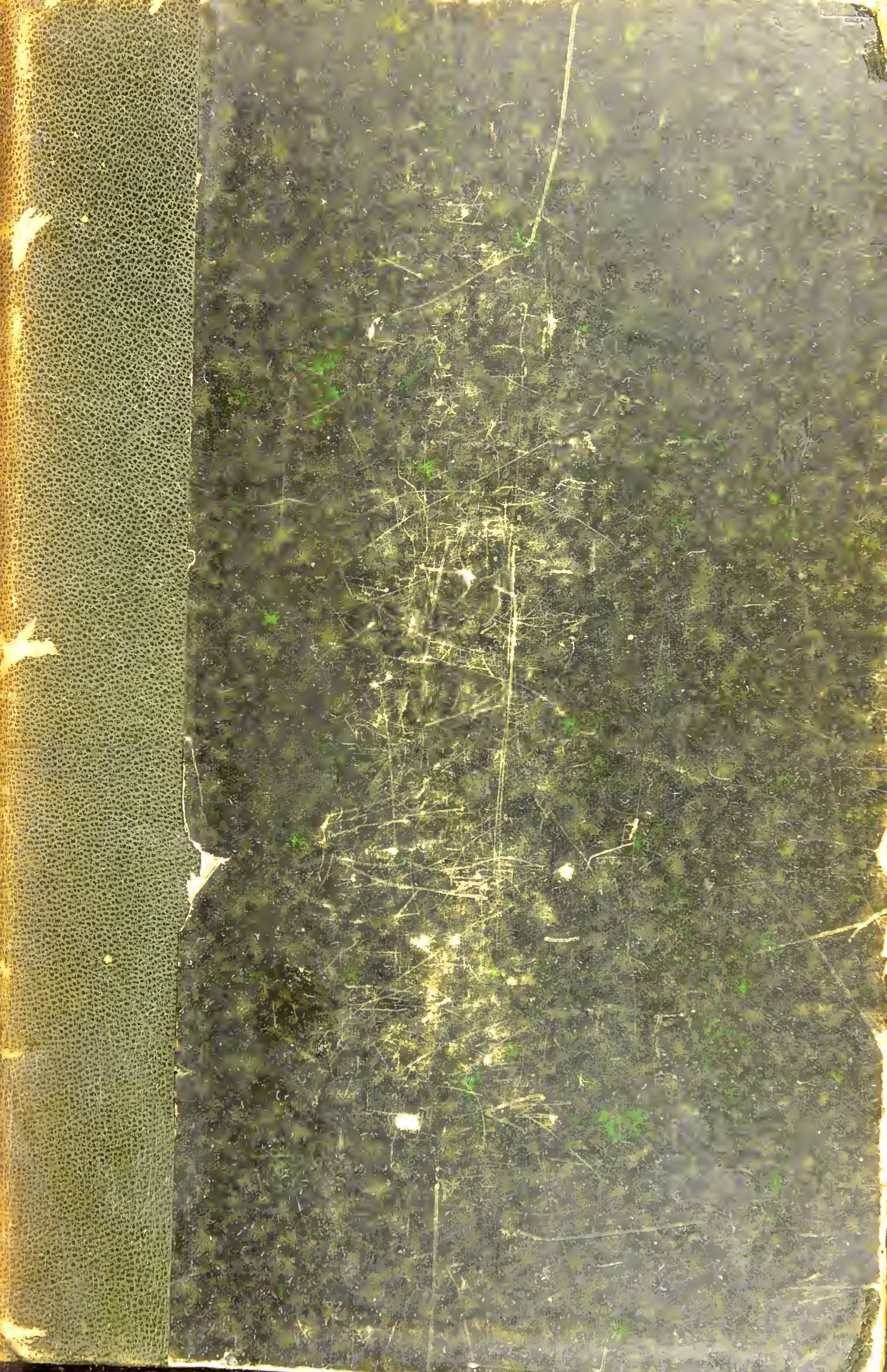
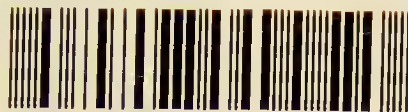



LSHTM
0011376301



MANUALE

DELL'IGIENISTA

Volume I — Parte 2ª

MANUALE
DELL'IGIENISTA

AD USO

di Ufficiali sanitari, Medici circondariali e provinciali, Ingegneri, Chimici e Veterinari igienisti, Uffici e Laboratori d'Igiene

PER CURA DEL PROFESSORE

ANGELO CELLI

Direttore dell'Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

CON LA COLLABORAZIONE DI

G. Alessandrini, G. Bertolini, O. Casagrandi, D. De Blasi, T. Gualdi, E. Raseri, G. Roster, A. Scala, D. Spatàro

---

Quarta Edizione interamente rifatta

Volume Primo - Parte 2ª

Microscopia applicata all'Igiene — Parassitologia — Protozoologia Batteriologia.





TORINO
UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO - NAPOLI - PALERMO - ROMA
1912


LONDON SCHOOL OF HYGIENE AND TROPICAL MEDICINE
LIBRARY
11 DEC 1958

O. CASAGRANDI

MICROSCOPIA APPLICATA ALL'IGIENE.

MICROSCOPIA APPLICATA ALL' IGIENE.

La microscopia applicata all'igiene si occupa dell'esame:

1° delle carni, del grasso, del latte, del burro, del formaggio; delle farine, del pane, delle paste; del caffè, del thè, del cioccolatto, dello zucchero, del miele, delle droghe, delle conserve; del vino, dell'aceto, della birra, ecc.;

2° dell'aria, dell'acqua, del suolo, ecc.;

3° dei tessuti delle pelliccerie, della carta, ecc.

MICROSCOPIO.

Lo strumento necessario per questo genere di ricerche igieniche è il microscopio così detto composto, quello stesso cioè che è necessario all'istologo, al patologo, al clinico, al batteriologo e che all'igienista deve essere famigliare anche nella pratica epidemiologica e profilattica, quando deve procedere all'accertamento della diagnosi delle malattie infettive.

Esso consta di due parti: la parte meccanica e la parte ottica.

La parte meccanica, costituita dal così detto stativo, si compone di una *base* generalmente a ferro di cavallo, la quale sostiene una *colonna* verticale. Verso la metà dell'altezza di questa colonna è applicata ad angolo retto una piastra metallica forata nel centro, annerita ovvero coperta di vetro e più generalmente di ebanite, molto gradevole al tatto, resistente agli acidi, di forma quadrata, rettangolare o rotonda, fissa o mobile, ed in tal caso munita di viti per il centramento. Da questa piastra, detta *tavolino portoggetti*, la colonna viene divisa in due parti, le quali nei microscopi grandi sono articolate fra di loro. Solo nei microscopi così detti inglesi, nei quali è stata molto studiata la parte meccanica, la base è costituita da un trepiedi, sul quale si articola la porzione del microscopio portante il tavolo portoggetti e il tubo portalenti.

La porzione superiore della colonna porta un braccio al quale è annessa o una guaina, entro cui scorre a dolce sfregamento il tubo portalenti, ovvero una doccia, entro cui scorre un'asta dentata, che è annessa al tubo portalenti e che viene con questo alzata od abbassata per mezzo di apposita ruota dentata. Essa è altresì mobile dall'alto al basso per mezzo di una vite micrometrica, che ordinariamente si trova all'estremo della colonna, ma che può trovarsi anche immediatamente al disotto del tavolino portoggetti o lateralmente (nuovi modelli).

Il movimento della vite micrometrica si può anche arrestare stringendo, in alcuni microscopi, apposita vite, la quale si trova nella colonna.

Nei moderni microscopi la vite micrometrica è posta lateralmente, cioè, come si dice, il movimento micrometrico è comandato da bottoni laterali. Resta così perfettamente indipendente il tubo portalenti dalla colonna che lo sostiene, di modo che prendendo il microscopio per sollevarlo e trasportarlo non evvi mai pericolo che si leda il movimento micrometrico. Si aggiunga che il sistema, che è del Max Berger, permette di usufruire di un movimento micrometrico di maggiore finezza.

Sotto il tavolino portoggetti si trova poi il cosidetto *diaframma a iride*, che nei microscopi di recente costruzione sostituisce il vecchio *portadiaframmi*, nel quale si possono collocare delle piastrine forate (diaframmi piani), ovvero i cosidetti diaframmi cilindrici, di cui se ne costruiscono anche ad iride, i quali sostituiscono tutti gli altri. Vi sono del resto anche modelli in cui questi congegni sono sostituiti da una unica piastra girevole a fori di varia grandezza che possono farsi corrispondere, a seconda dal bisogno, al foro che si trova nel tavolino portoggetti: sono specialmente quelli nei quali non è applicabile il condensatore della luce di Abbe, come i piccoli modelli di Hartnack.

LA PARTE OTTICA si compone dei sistemi di lenti per l'ingrandimento e dell'apparecchio di illuminazione.

I sistemi di lenti per l'ingrandimento sono due: l'*obbiettivo* e l'*oculare*, i quali sono tenuti assieme da un tubo che oggidì si fa in due pezzi (di tre solo nel microscopio tascabile di Beale) di cui il superiore entra a dolce sfregamento nell'inferiore. Nel segmento superiore si trova una graduazione che permette di regolare a volontà, entro certi limiti, la distanza fra l'appoggio dell'obbiettivo e quello dell'oculare. Questo tubo è generalmente unico e dritto, ma può essere doppio come nei microscopi binoculari di Wenham o piegato ad angolo retto, come nei microscopi di Chevalier ed Amici. Però tale disposizione, necessitando l'interposizione di prismi, non è favorevole alla chiarezza delle immagini specialmente quando si adoperano obbiettivi forti; quindi non è stata adottata. Solo recentemente la ditta Zeiss ha costruito veri microscopi binoculari a distanza focale forte e a grande potere di penetrazione, i quali fanno vedere gli oggetti come in rilievo; ma gli ingrandimenti che dànno sono ancora troppo piccoli.

L'ordinario tubo doppio va alzato sino a 160 mm., poichè la maggior parte dei sistemi sono corretti per una lunghezza del tubo di 160 mm. calcolata dal piano di appoggio dell'obbiettivo a quello dell'oculare, cioè dal punto di innesto dell'obbiettivo al tubo portalenti, all'estremità superiore dell'oculare.

Nei grandi modelli il tubo superiore è graduato a centimetri divisi in decimi, nei medî e piccoli evvi un solo segno 16 oppure due segni 16 e 16 r: al primo corrisponde l'altezza cui si deve alzare il tubo perchè risponda ai 160 mm. senza il revolver, al secondo la stessa altezza quando al tubo portalenti sia anche avvitato il revolver.

L'*obbiettivo* consta di un sistema di lenti, di cui l'inferiore prende il nome di lente frontale e la superiore di lente emergente, il quale sistema dà un'immagine rovesciata ingrandita e reale di un oggetto posto al di là del suo fuoco, cioè fra la semplice e la doppia distanza focale. Generalmente ogni sistema obbiettivale è formato da tre doppiette, ossia, dall'unione di due lentine l'una piano-concava e l'altra biconvessa, tenute assieme da balsamo del Canadà, delle quali lenti, quella piano-concava guarda in basso con la sua parte piana. E dico, generalmente, perchè nei sistemi obbiettivali ad immersione vi sono doppiette e triplette in numero diverso.

Gli obbiettivi *comuni* diconsi *acromatici* o *aplanatici*, perchè mediante opportune combinazioni cercano di correggere la aberrazione di refrangibilità e quella di sfericità.

Infatti per correggere il cromatismo nelle doppiette la lente piano-concava è di vetro *crown*, mentre la biconvessa è di *flint*: però non si tratta mai di una correzione completa, giacchè non viene realmente corretta che l'aberrazione dei due ultimi colori dello spettro, il violetto ed il rosso, non quelle degli intermedi. Così, per correggere il vizio di sfericità, oltre a studiar bene le curvature delle singole lenti, cercando di adoperare lenti poco convesse, vengono interposti diaframmi tra le diverse doppiette o triplette.

Gli obbiettivi che diconsi *apocromatici* sono quelli prima costruiti dallo Zeiss con vetri speciali di borato e fosfato, i quali hanno un forte grado di aplanatismo e acromasia, e permettono quindi anche l'uso di oculari molto potenti. Questi obbiettivi hanno un forte angolo di apertura numerica e una forte distanza focale; e, permettendo di osservare a forti ingrandimenti immagini ben chiare di oggetti, almeno nell'asse ottico del microscopio, servono ottimamente per rilevarne i particolari più delicati.

Finalmente vi sono anche gli obbiettivi *pantacromatici* (Leitz), *semiapocromatici* (Koristka), rappresentati da sistemi di lenti che, per l'impiego nella loro fabbricazione di vetri speciali, sono più corretti degli acromatici per ciò che si riferisce al vizio di cromaticità e sfericità; ma non raggiungono però la correzione degli apocromatici. Con questi obbiettivi i fabbricanti hanno tentato di fornire dei sistemi di lenti (non

così alterabili come quelli degli apocromatici), ai quali fosse possibile applicare gli oculari compensatori e ottenere, anche con ingrandimenti discretamente forti, immagini chiare.

Gli obbiettivi distinguonsi poi: in quelli *a secco*, quando tra la lente frontale e il vetrino coproggetti rimane una strato di aria, e *a immersione* se tra la lente frontale e il vetrino coproggetti viene posto un liquido il cui indice di rifrazione avvicinandosi a quello del vetro, permette che i raggi emergenti dall'oggetto sieno meno deviati. Come liquido venne dapprima usata l'acqua, la quale ora serve soltanto in casi speciali, per es., per l'osservazione di organismi viventi tenuti in camere umide con obbiettivi a grande distanza focale (D* Zeiss). Oggi invece usasi l'olio di cedro, il cui indice di rifrazione (1.515) si avvicina molto di più a quello del vetro (1.555). Soltanto con un obbiettivo speciale costruito dallo Zeiss, si può sostituire all'olio la monobromonaftalina, che ha lo stesso indice di rifrazione del vetro della lente: occorre però in questo caso che gli oggetti vengano inclusi in liquidi speciali (ioduro di mercurio, ecc.) e che i vetri coproggetti siano di un determinato spessore e di flint.

Esistono anche i così detti *obbiettivi a correzione*, nei quali, mediante un collare graduato, attorno al tubo portadoppiette, girevole attorno al proprio asse, la lente frontale dell'obbiettivo può avvicinarsi od allontanarsi dalle altre, in modo da poter raccogliere quei raggi luminosi che per il diverso spessore dei vetrini coproggetti andrebbero dispersi: queste lenti però sono poco adoperate, perchè i fabbricanti hanno corretto i loro sistemi obbiettivali per i vetrini coproggetti più in uso, aventi uno spessore di mm. 0.11. nonchè per una determinata lunghezza di tubo, generalmente 15-17 cm.

Gli obbiettivi si indicano variamente a seconda dei diversi fabbricanti. Gli acromatici a secco con numeri o lettere progressive indicano via via un grado di ingrandimento maggiore, senza però stabilirlo, e quelli ad immersione indicano in frazione di pollice inglese la loro distanza focale equivalente ossia la distanza focale di una lente semplice che produrrebbe lo stesso ingrandimento. Gli apocromatici vengono indicati con la loro distanza focale equivalente, espressa in millimetri e con l'*angolo di apertura numerica*, col quale s'intende la così detta « superficie lenticolare utile » ossia quel fascio angolare di luce, avente il vertice nell'oggetto, e utilizzabile dalla lente per formare la immagine.

L'apertura numerica si esprime moltiplicando l'indice di rifrazione del mezzo interposto tra la lente frontale e la superficie superiore del vetrino coproggetti (aria, olio di cedro, acqua) per il seno dell'angolo formato dai raggi provenienti da un punto dell'oggetto. Si è così veduto che la massima apertura numerica per gli obbiettivi a secco sarebbe di 1.00, quella per gli obbiettivi a immersione ad olio 1.52. quella per gli obbiettivi ad acqua 1.33.

Quanto più grande è l'angolo di apertura che ha un sistema obbiettivale, tanto maggiore è quindi la quantità dei raggi luminosi provenienti dall'oggetto ossia quel che si chiama il potere di risoluzione delle lenti e quanto più grande la distanza focale tanto più commendabile è ancora l'obbiettivo. Però siccome un grande angolo di apertura porta con sè un minore potere di definizione e di penetrazione, per cui non è più possibile distinguere i vari piani del preparato, così i migliori obbiettivi apocromatici ad immersione omogenea, non dispongono che di una distanza focale di 2 mm. con 1.40 e tutt'al più 1.50 di apertura numerica, quelli ad acqua di 1.20 e quelli a secco di 0.95.

Gli obbiettivi si innestano al tubo portalenti o per mezzo di un pezzo di ricambio oppure direttamente a slitta. È anche molto pratico innestarveli con l'intermezzo del così detto revolver ossia di una piastra che può ricevere 2, 3, 4 obbiettivi i quali possono essere successivamente portati in asse.

L'*oculare* (e per oculare s'intendono generalmente i così detti *oculari ordinari* o *di Huygens* o *di Campani*) è costituito da un sistema di lenti che dà una immagine virtuale dritta e ingrandita di un oggetto che si trova fra il suo fuoco e la lente, e che è rappresentato dall'immagine data dall'obbiettivo. Esso spiega la sua massima potenza a tubo alzato nei microscopi ordinarii a 15-17 cm.

L'*oculare Huygens* è formato da due lenti piano-convesse, con la faccia piana rivolta in alto: di queste lenti la inferiore prende il nome di *lente collettrice* o di *campo*, la superiore di *lente oculare*; quest'ultima ha una distanza focale doppia della precedente. Esse sono disposte. in modo che il fuoco delle due lenti cada nello stesso punto.

Si conoscono poi oculari nei quali una delle lenti cerca di correggere il vizio di cromaticità dell'altra e sono questi i così detti *oculari aplanatici od ortoscopici*, ed altri che, a mezzo dell'interposizione di prismi, riducono dritta l'immagine fornita rovesciata dall'obbiettivo. Ma essi non sono affatto in uso, come non è in uso l'*oculare di Ramsden*, nel quale l'immagine cade appena al disotto della lente collettrice, per cui una piccola scalfittura, uno sporco qualsiasi su questa lente, diventa visibilissimo.

Sono invece ormai molto adoperati i così detti *oculari compensatori* costruiti la prima volta dallo Zeiss, per gli obbiettivi apocromatici. Questi oculari devono il loro nome al fatto che compensano mediante una correzione in senso opposto la differenza di ingrandimento per i diversi colori che hanno tutti i forti obbiettivi, sicchè col loro uso si toglie la differenza cromatica dell'ingrandimento per la zona periferica del campo. Essi cioè hanno un potere di ingrandimento maggiore per il rosso che per il bleu, mentre gli obbiettivi apocromatici ingrandiscono più fortemente il bleu. Accoppiando i due sistemi, l'immagine appare sino all'orlo del tutto incolora. In questi oculari la disposizione delle lenti a volte è come negli Huygens, altre volte come nei Ramsden: in

ogni caso però sono fatti in modo che il punto focale inferiore occupa in tutti la stessa posizione nel tubo del microscopio, per cui si può cambiare oculare durante qualunque osservazione, senza spostare il tubo del microscopio. Va anche notato che si possono adoperare con gli obbiettivi acromatici, pantacromatici e semiapocromatici, od almeno con quelli che non dànno fortissimi ingrandimenti.

Nella costruzione di questi oculari sono stati fatti anche dal punto di vista tecnico dei notevoli progressi. Ve ne sono dei diaframmabili, con diaframma ad iride, a lungo fuoco, con indicatori dei punti delle preparazioni, ecc.

Gli oculari Huygens vengono indicati con cifre arabe o romane progressive: le cifre più alte stanno ad indicare una potenza di ingrandimento maggiore senza però stabilirla. Gli oculari compensatori sono indicati con cifre, ognuna delle quali corrisponde al numero delle volte che l'oculare ingrandisce l'immagine data dall'obbiettivo.

Gli oculari si introducono direttamente nel tubo portalenti a scivolo. Vi sono anche congegni che permettono di porre sopra una specie di revolver per gli oculari, 2-3 oculari, in modo da poter metter in asse or l'uno or l'altro. Sono però assai meno pratici dei revolver per gli obbiettivi.

L'*apparecchio di illuminazione* è collocato tra il piede e il tavolino portoggetti. Nei microscopi ordinari, per i quali non necessita che l'uso di lenti a secco a mediocre ingrandimento, è rappresentato dal solo specchio che è piano da un lato e dall'altro concavo: il primo adoperasi quando la sorgente luminosa è lontana, il secondo quando è vicina o quando, pur essendo lontana, c'è bisogno di maggior chiarezza nel campo visivo.

Allorchè si usano lenti ad immersione od anche lenti a secco che dànno forti ingrandimenti, si intercala tra il portadiaframmi e il tavolino portoggetti il così detto condensatore della luce, che per lo più è quello di Abbe. Esso è costituito da 2-3 grandi lenti piano-convesse, con la parte piana rivolta in alto, rifrangenti la luce trasmessa dallo specchio nel foco che trovasi pressochè nel piano del preparato. Siccome poi il sistema di lenti del condensatore ha un grande angolo di apertura, il campo illuminato è ampio. Nei grandi microscopi questo apparecchio è mobile dall'alto al basso per mezzo di apposito movimento a cremagliera (pignone ad asta dentata per il movimento di alzata e discesa) e ciò serve a portare esattamente il suo punto focale nel piano del preparato, a seconda dello spessore del vetro portoggetti, oppure ad allontanarnelo in maniera da diminuire l'illuminazione del preparato. Adoperando il condensatore, la superficie riflettente dello specchio è quella che apporta un angolo di apertura maggiore, cioè la piana: però questo sempre nel caso che la sorgente luminosa sia lontana.

Nella pratica, ad ogni modo, non sempre si segue questa regola, perchè la generalità si abitua ad usare in ogni caso lo specchio concavo. Del resto questa è una necessità, qualche volta, se lo specchio piano riflette l'intelaiatura delle finestre che compaiono nel campo microscopico come grandi linee nere perturbatrici.

In alcuni microscopi si possono far eseguire al condensatore anche dei movimenti laterali, lo si può spostare lateralmente, dopo averlo abbassato, o anche da una parte.

In questi ultimi tempi si è anche cercato di sostituire all'apparecchio di Abbe dei sistemi di lenti atti a maggiormente illuminare il campo microscopico. In fondo non si tratta che di obbiettivi che si fanno funzionare con la lente frontale rivolta in alto. Uno di questi è di recente stato fabbricato a quest'unico scopo dal Koritska. È il *condensatore acromatico ad immersione omogenea* (fig. 175) di mm. 5.6 di fuoco e di apertura mm. 1.30. È in sostanza un obbiettivo ad immersione omogenea con buona correzione centrale acromatica e sferica, in virtù della quale proietta la sorgente luminosa nel piano del preparato senza formare contorni colorati.

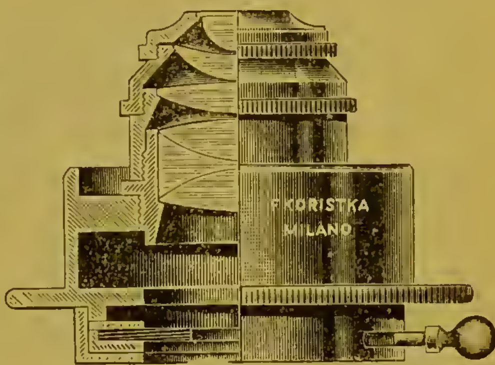


Fig. 175.

Per ricerche molto fini è vantaggiosa la luce monocromatica, ottenuta con forti mezzi di dispersione, e perfino l'ultravioletta che permette di fotografare particolari direttamente non visibili e talora può anche provocare la fosforescenza e quindi permettere la visione diretta. (Khöler).

ANDAMENTO DEI RAGGI NEL MICROSCOPIO. — Chi usa il microscopio, sarebbe sempre bene conoscesse l'andamento dei raggi che conducono a formare l'imagine ingrandita dell'oggetto. Parmi quindi utile riportare la descrizione fattane dalla Casa Zeiss di Jena sopra uno schema che trovasi in cartellone in tutti gli Istituti e che è rappresentato in piccolo dalla figura 176.

Nello schema della marcia dei raggi è l'*obbiettivo acromatico AA* che è stato figurato. È costituito da due lenti composte ciascuna di due vetri. Quando questo obbiettivo è combinato, come lo si è ammesso nella figura, con l'oculare Huygens 2, la *distanza frontale*, cioè la distanza tra la superficie anteriore della lente inferiore e la superficie del vetrino copri-oggetti misura circa mm. 7.5. La distanza focale dell'obbiettivo *AA* è di 17 mm. Il punto nodale anteriore a partire dal quale si misura la distanza focale, cade, per conseguenza, press'a poco nel mezzo tra le due lenti, perchè il fuoco anteriore (inferiore) si trova immediatamente al disopra del piano degli oggetti *O*. Come mostra lo schema II, il fuoco posteriore (superiore) è situato nella lente superiore dell'obbiettivo. Il piano focale F'_1 indica il suo posto.

L'oculare Huygens 2 porta, come tutti i nostri oculari Huygens, due lenti non acromatiche. Il fuoco anteriore di questo oculare è situato tra le lenti, un po' al di sopra del piano O^{**} del diaframma oculare come lo ndica il piano F_2. La lente inferiore dell'oculare si chiama *lente di campo*, la lente superiore *lente oculare*. L'immagine formata dall'obiettivo solo cadrebbe nel piano O^*, se la lente di campo non intercettasse i raggi. L'immagine formata dall'obbiettivo e la lente di campo cade nel piano del diaframma dell'oculare.

Questa immagine, situata nel piano O^{**}, è esaminata dall'osservatore attraverso la lente oculare. Sulla figura, si è ammesso che l'occhio dell'osservatore è accomodato o corretto dalla vista delle distanze, si è dunque collocato il diaframma oculare nel piano focale anteriore della lente oculare. I fasci che vengono dai differenti punti dell'immagine reale in O^{**} sono dunque costituiti dai raggi paralleli quando essi penetrano nell'occhio.

Sullo schema II, tre raggi che emanano da punti differenti dell'oggetto sono rappresentati. Essi sono disegnati paralleli tra loro e si tagliano per conseguenza dopo avere traversato l'oggetto nel piano focale posteriore F'_1 Avendo percorso la lente di campo, essi passano per i bordi del diaframma oculare e *limitano il campo visivo*. Il diaframma oculare funziona dunque come *diaframma del campo visivo*. Dopo aver passato la lente oculare, questi stessi raggi limitano, per conseguenza, l'angolo sotto il quale l'osservatore vede l'immagine microscopica, il suo occhio sia o non accomodato dalle distanze. Questo angolo che determina la grandezza dell'immagine formata sulla retina dell'osservatore, ha la funzione preponderante nell'apprezzamento dell'immagine formata dal microscopio intiero. La distanza alla quale l'occhio localizza l'immagine non ha che una importanza tutta secondaria; ne risulta che trascurando le differenze insignificanti tra i diversi occhi, la grandezza dell'immagine retinica è la stessa per i miopi, i presbiti e le persone a vista normale.

Sulla figura, la distanza tra il piano O^{***}, nel quale si è localizzata la immagine, e il piano F' è uguale alla distanza della *visione distinta S* (250 mm.). È per questa distanza che sono calcolati gli ingrandimenti indicati nelle tavole di ingrandimenti.

Come lo fa vedere lo schema I, il raggio che percorre l'asse dello strumento forma l'asse del fascio di raggi che emanano dal punto dell'oggetto situato nel mezzo del campo; si chiama questo raggio il *raggio principale* del fascio. I due raggi laterali dello schema II sono egualmente dei raggi principali, perchè essi formano gli assi di fasci che emanano dai punti laterali dell'oggetto. È per questo che si chiama il fascio rappresentato nello schema II un *fascio di raggi principali*.

Sullo schema I non s'è rappresentato che il fascio emanante dal punto assiale dell'oggetto; i fasci emessi dagli altri punti del campo dell'oggetto potrebbero essere disegnati in una maniera del tutto analoga. Seguendo il percorso dei raggi si vede che i limiti del fascio sono determinati dalla montatura della lente superiore dell'obbiettivo, perchè tutta l'apertura di questa lente è traversata dai raggi.

Si chiama *apertura angolare* l'angolo di apertura dei fasci che emanano dai punti dell'obbiettivo e traversano l'obbiettivo. Ma il valore di questo angolo non fornisce la misura corretta dell'effetto ottico dell'obbiettivo. Le

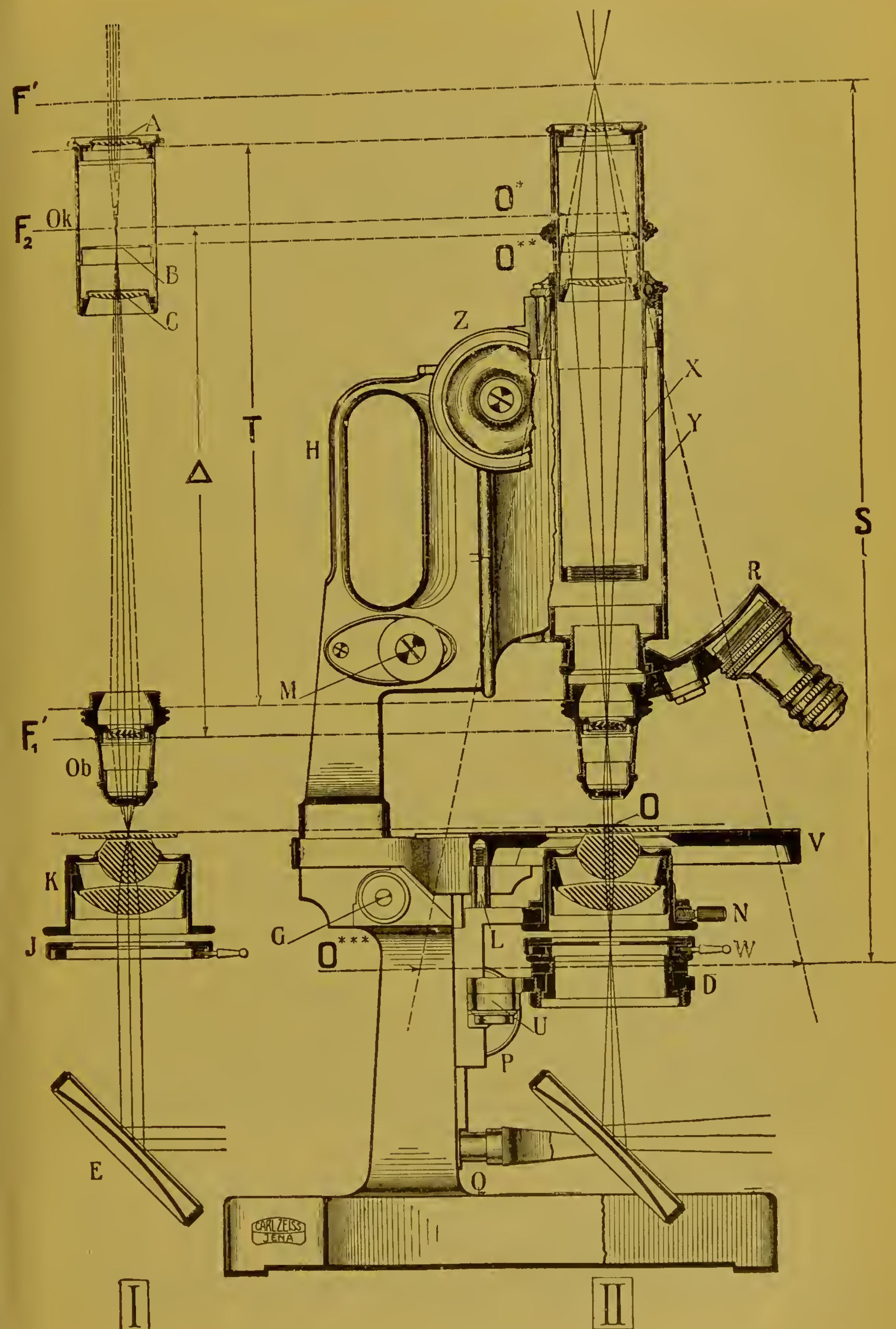

F'
A
Ok
F2
B
C
O*
O**
Z
X
Y
H
T
Δ
S
R
M
F1'
Ob
O
V
K
N
J
G
O***
L
W
D
U
P
E
Q
CARL ZEISS JENA
I
II

Fig. 176.

ricerche fondamentali d'Abbe sulla formazione delle immagini microscopiche hanno dimostrato che questo effetto è determinato dall'*apertura numerica* dell'obbiettivo che è uguale al seno della metà dell'apertura angolare (1).

Il diaframma che limita l'angolo di apertura — nel caso rappresentato dalla figura, la montatura della lente superiore dell'obbiettivo — è chiamato *diaframma di apertura*. Come lo fa vedere lo schema I, il diametro di questo diaframma determina, inoltre, l'angolo di apertura dei fasci che si dirigono verso l'immagine dell'oggetto. Prima di entrare nell'oculare, i raggi prolungati di questi fasci si incrociano nei punti del piano O^*, ma il vetro di campo riporta i punti di incrociamento nel piano del *diaframma del campo visivo* O^{**}. Dopo avere attraversato la lente oculare i raggi dei fasci sono paralleli e possono andare a formare un'immagine sulla retina d'un occhio accomodato o corretto per la visione delle distanze.

Come lo fa vedere lo schema II, i raggi principali di tutti i fasci emanati dai diversi punti dell'oggetto si incrociano, dopo avere attraversato il microscopio, nel suo piano focale posteriore F' ed è anche in questo piano che cade — almeno nel caso rappresentato dalla figura — l'immagine del diaframma dell'obbiettivo formato dall'oculare. Questa immagine si chiama *circolo di Biot, di Ramsden* o (secondo Abbe) *pupilla di emergenza del microscopio intiero*.

La si vede formare un circolo chiaro un po' al di sopra dell'oculare. Tutti i fasci che vengono dall'immagine microscopica hanno questo circolo per base. Se la pupilla dell'osservatore è collocata nello stesso piano e non è più piccola della pupilla di emergenza, tutti i raggi che vengono dalla immagine microscopica saranno ricevuti dall'occhio.

Ingrandimento e valore ottico dei microscopi. — I fabbricanti aggiungono ai microscopi una tabella per gli ingrandimenti coi vari sistemi di lenti a tubo alzato (generalmente a 160 mm.). Si può però determinare il numero delle volte che il sistema oculo-obbiettivale ingrandisce un oggetto quando si conosce la distanza focale della lente e il numero delle volte che l'oculare ingrandisce l'immagine data dall'obiettivo. All'uopo si divide 250 (2) per la distanza focale della lente obbiettivale espressa in millimetri ed il quoziente, che rappresenta l'ingrandimento del sistema obbiettivale, si moltiplica per il numero segnato sull'oculare se si tratta di un compensatore, o per i numeri 3, 4, 5, 7, 9.25 (lenti Koristka) se trattasi di oculari Huygens contrassegnati rispettivamente coi numeri 1, 2, 3, 4, 5. Si comprende come tale ricerca sia possibile soltanto quando vengano adoperati obbiettivi apocromatici od anche semi- e pantacromatici in cui sia indicata la distanza focale equivalente in millimetri.

(1) Per gli obbiettivi ad immersione, questo valore dovrà ancora essere moltiplicato per l'indice di rifrazione del liquido d'immersione.

(2) Questa cifra rappresenta la distanza visiva massima a cui si forma l'immagine più netta dell'oggetto. Supponendo infatti di adoperare l'obbiettivo come lente semplice e di osservare un oggetto posto nel suo fuoco, l'immagine si viene a proiettare a 250 mm. dall'occhio, 250 essendo appunto il limite che si ammette per la visione distinta.

Qualora poi si voglia conoscere l'ingrandimento di un dato sistema oculo-obbiettivale e si possegga un micrometro obbiettivo, si può giungervi servendosi di quell'apparecchio, detto *camera lucida*, il quale serve a disegnare gli oggetti che si guardano al microscopio. A tal uopo, si mette a foco il micrometro obbiettivo e si applica all'oculare la camera lucida, poi si disegnano sulla carta le divisioni che si vedono nel campo microscopico e si misura la distanza tra una divisione e l'altra. Se per es. ogni divisione misura 10 mm., vuol dire che ogni divisione del micrometro obbiettivo, che è di un centesimo di millimetro, è stata ingrandita 1 × 10 × 100, cioè 1000 volte.

In alcuni microscopi, e precisamente in quelli di Zeiss, è ancora possibile applicare al tavolino portoggetti il così detto *micrometro a vite*, col quale, senza bisogno di altri apparecchi, si può conoscere la grandezza dell'oggetto che si osserva: lo strumento però è alquanto complicato e molto costoso.

Oltre l'ingrandimento è utile conoscere, nella pratica, il così detto *valore ottico* del microscopio, mediante il quale si può sapere fino a che limite di grandezza, con un dato sistema oculo-obbiettivale, si possono distinguere gli oggetti l'uno dall'altro in un dato campo microscopico. Il procedimento più alla mano è quello di Harting. Si prende una reticella metallica a maglie strette, si attacca in un modo qualunque al portadiaframmi, si mette sul tavolino portoggetti un preparato di acqua gommata sbattuta in maniera da contenere molte bollicine di aria e si mette a foco una bollicina. Osservata subito in essa l'imagine di un quadratello della reticella composto di un certo numero di maglie, si applica il micrometro oculare, e si comincia ad abbassare il portadiaframmi e quindi la reticella sino a che i fili di essa siano distinguibili nella bolla di aria. Conoscendo il valore micrometrico dell'obbiettivo, si calcola allora il valore apparente di tutto il quadratello: se, per es., misurerà 1 μ di lato e conterrà 10 maglie, ogni maglia verrà ad avere un decimo di μ di lato, e ciò vorrà dire che il sistema di lenti potrà far vedere distinti gli oggetti sinchè distano fra di loro un decimo di μ.

MISURAZIONE DEGLI OGGETTI CHE SI OSSERVANO AL MICROSCOPIO. — Gli oggetti che si osservano al microscopio si misurano mediante il cosiddetto micrometro oculare, rappresentato da una lastrina di vetro in cui 10 mm. sono divisi in 100 parti. Questa lastrina si colloca con la parte segnata rivolta in basso sopra o sotto il diaframma che sta tra la lente oculare e la lente collettiva, ossia nel posto preciso dove si forma l'immagine reale, e la si mette a foco alzando o abbassando opportunamente la lente oculare. Posto poi a foco l'oggetto di cui si vogliono conoscere le dimensioni, si conta il numero delle divisioni del micrometro oculare che comprendono l'immagine microscopica e si moltiplicano queste ultime per il valore delle divisioni micrometriche con quel dato obbiettivo, valore che trovasi segnato nella tavola degli in-

grandimenti. Questo valore per gli obbiettivi aplanatici ordinari è indicato volta per volta dal fabbricante, essendo variabile da una partita all'altra di obbiettivi; per quelli apocromatici invece è fisso e, quindi, identico in tutte le tavole degli ingrandimenti fornite dai fabbricanti. Il prodotto, poi, che risulta moltiplicando il numero delle divisioni comprendenti l'oggetto per il valore micrometrico dell'obbiettivo, rappresenta le dimensioni dell'oggetto espresse in millesimi di millimetro o *micron* (μ).

Faccio notare che in varii trattati il *micron* è fatto sinonimo di micromillimetro: questo però è un errore. Il micromillimetro non è infatti la millesima parte del millimetro, ossia il micron, ma la milionesima e si indica con $\mu\mu$.

Per avere una cifra esatta occorre però che il micrometro oculare venga usato sempre collo stesso oculare, generalmente il 2 Huygens o il 6 compensatore, perchè l'ingrandimento che le divisioni del medesimo subiscono per opera della lente oculare non venga a cambiare. Di più occorre che il tubo sia alzato (questo come regola generale) a 160 o a 150 mm. se è applicato il revolver porta-obbiettivi.

Qualora non si conoscesse il valore micrometrico dell'obbiettivo, bisogna fare uso del così detto micrometro-obbiettivo, ossia di una lastrina di vetro in cui un millimetro è diviso in 100 parti ed ogni parte per conseguenza corrisponde a 10 μ. Questa lastrina si sostituisce al preparato microscopico e, tenendo in sito il micrometro-oculare, si conta quante divisioni di quest' ultimo vengano comprese in una divisione del micrometro-obbiettivo: se, per es., 5 divisioni del micrometro-oculare sono comprese in una del micrometro-obbiettivo, avremo che ciascuna divisione del micrometro-oculare avrà il valore di $10 : 5 = 2\ \mu$.

Avendo il solo micrometro-obbiettivo si può, ponendo il materiale da esaminare sul medesimo e facendolo servire da lastrina portoggetti, calcolarne direttamente le dimensioni; però ciò non è possibile fare con oggetti già montati in preparazioni fisse.

Si può anche stabilire lo spessore di un oggetto per mezzo della vite micrometrica. Specie nei microscopi con vite micrometrica laterale dotata di una grande delicatezza di movimento, il calcolo è abbastanza facile. Basta sapere a quale frazione di mm. corrisponde ogni divisione del tamburo del bottone della vite. Così nei microscopi Koritska si sa che ogni divisione marca spostamenti di $^{2}/_{1000}$ di mm. Siccome poi l'intervallo tra i tratti è di 4 mm., così si può stimare benissimo ad occhio anche uno spostamento verticale di $^{1}/_{2}$ millesimo di mm.

Uso del microscopio. — Nell'adoperare il microscopio bisogna avere delle cure speciali:

1° nella messa a foco:

a) fare scendere il tubo portalenti per gli obbiettivi a secco più presso che sia possibile al foco e per gli obbiettivi ad immersione sino ad immergere la lente frontale nella goccia di liquido;

b) aggiustare lo specchio e i diaframmi opportunamente, prima di far uso della vite micrometrica, e usare lo specchio concavo quando la sorgente luminosa è vicina, aprendo o togliendo il diaframma, ciò che è necessario per le preparazioni colorate; usare lo specchio piano quando si abbia la sorgente luminosa lontana e diaframmi con fori più o meno stretti, ciò che è necessario per le preparazioni incolori o poco colorate;

c) muovere il preparato col pollice e l'indice della mano sinistra; quando passa qualche ombra, far corrispondere questa al centro del campo, abbassare ancora un poco il tubo e finire di mettere a foco muovendo in un senso o nell'altro la vite micrometrica, sempre evitando di farle eseguire molti giri;

2° nell'adoperarlo:

a) guardare con un occhio nel sistema oculare, cercando di abituarsi a tenere aperto l'altro occhio; muovere con il pollice e l'indice della mano destra in un senso e nell'altro la vite micrometrica, per osservare tutti i piani del preparato, badando di fare movimenti appena percettibili quando si adoperano forti ingrandimenti, e più ampi quando non si adoperano forti ingrandimenti;

b) aggiustare convenientemente durante l'osservazione l'illuminazione del campo visivo, sostituendo, ove occorra, lo specchio piano al concavo; la luce obliqua alla diretta, ciò che si ottiene spostando lateralmente all'asse ottico del microscopio lo specchio e in quella posizione raccogliendo i raggi della sorgente luminosa e dirigendoli nel preparato.

c) sapere al momento opportuno, sempre che occorra, far agire dei reagenti sotto il campo microscopico, ponendo una goccia di liquido lateralmente al vetrino coproggetti e aspirando dall'altra con carta bibula; e, durante queste ricerche microchimiche, badar bene di non sporcare la lente frontale dell'obbiettivo, inconveniente che ove si avverasse bisognerebbe cercare di rimediare lavando subito l'obbiettivo con acqua e poi asciugandolo. Ricordare che nella composizione del flint c'è il piombo, che i vapori di NH_3 e gli alcali a lungo andare intaccano le lenti e così i vapori degli acidi nitrico, cloridrico e specialmente solforico. Se si dovessero fare a lungo ricerche del genere, sarebbe consigliabile adoperare stativi appositi, i così detti stativi da microchimica, nei quali l'obbiettivo sta al disotto del tavolino porta-oggetti con la lente frontale naturalmente rivolta all'insù e il tubo porta-oculare è fissato obliquamente al piede del microscopio: tra la luce dell'obbiettivo e il punto in cui è fissato l'oculare evvi poi un prisma perchè l'immagine data dall'obbiettivo giunga all'oculare; lo specchio si trova in alto al disopra del tavolino sostenuto da apposita asta;

3° nel riporlo:

a) alzare il tubo del microscopio, poi togliere il preparato, sempre dal davanti;

b) pulire la lente frontale in senso circolare con pezzuola di tela finissima, ripetutamente lavata ed asciutta: se la lente è sporca, pulirla con la pezzuola bagnata con benzina o xilolo, *non mai coll'alcool*, e poi di nuovo con la pezzuola asciutta;

c) non togliere l'oculare, lasciando a posto l'obbiettivo, ma togliere prima questo, poi quello;

d) se le lenti sono sporche, girarle in senso circolare, tenendo l'occhio applicato al microscopio per stabilire se siano quelle dell'obbiettivo o quelle dell'oculare e pulirle avendo cura di rivolgere sempre in basso la parte del tubo rimasta aperta, evitando però di svitare nei suoi singoli pezzi l'obbiettivo: qualora questo fosse necessario, è meglio inviare l'obbiettivo alla fabbrica;

e) tenere lontano il microscopio dalla luce solare o da sorgenti calorifiche;

f) coprirlo con una campana di vetro o con scatola di cartone;

g) dovendolo trasportare, prenderlo, se di vecchio modello, per il piede con una mano e con l'altra per la colonna al disotto della vite micrometrica.

Scelta del microscopio. — Varie sono le fabbriche di microscopi in Germania, in Francia, in Inghilterra. In Italia evvi quella del Koristka, raccomandabile sotto tutti i punti di vista.

Per gli scopi a cui deve servire in batteriologia e in microscopia, qualunque sia la fabbrica a cui ci si rivolga, il microscopio deve essere fornito, oltre che di lenti a secco, di una lente a immersione e quindi anche dell'apparecchio di Abbe.

Bisogna anzitutto cominciare con lo scegliere lo stativo:

A questo riguardo, giova sapere che i fabbricanti oltre agli stativi vecchi con vite micrometrica in alto o in basso movente tutta la colonna superiore, ne fabbricano altri con vite micrometrica laterale in cui il movimento del tubo portalenti è indipendente da quello della colonna. Questi microscopi sono certamente preferibili ai primi.

Tuttavia anche i primi sono buoni e si può in essi ovviare all'inconveniente citato, facendovi apporre apposita impugnatura fissata sotto al tavolino in modo che afferrando questa, resti libera la colonna che porta la vite micrometrica e le lenti.

Quando la scelta cada su modelli medî e grandi, e sovratutto quando cada su questi, lo stativo deve essere con vite micrometrica laterale e impugnatura sulla colonna. Quando cade su modelli piccoli, i vecchi modelli vanno benissimo. Del resto anche per i medî, quando si voglia economizzare, si può benissimo far cadere la scelta su quelli di vecchio modello.

Alcuni preferiscono nella scelta dei medî e grandi modelli, il tavolino girevole al tavolino fisso. Io consiglio sempre il tavolino fisso, specie a chi non è provetto in ricerche microscopiche.

Fatta la scelta dello stativo, si passa a quella delle lenti, per cui rimando alle combinazioni, di cui presento gli schemi più avanti.

Qui dirò che in ogni caso, prima di adoperare qualsiasi microscopio, occorre anzitutto osservare bene lo stato delle lenti.

Ciò in altri termini significa dare il proprio giudizio sui *poteri di definizione, di penetrazione, di acromatismo, di aplanasia*, ecc., del sistema

obbiettivale, del *valore ottico* in genere, di tutto il sistema oculo obbiettivale, e dello *stato di costruzione* dello stativo. Senza voler far torto a nessuno, è sempre consigliabile, per avere un giudizio esatto, rivolgersi a persona che abbia lavorato ed osservato con molte lenti diverse e dello stesso fabbricante e di altre fabbriche, e di non rivolgersi mai a chi, anche provetto in ricerche microscopiche, si è servito sempre del proprio microscopio.

Il microscopista deve provare gli obbiettivi acromatici con gli oculari Huygens, i semiapocromatici e pantacromatici con gli Huygens e con i compensatori, gli apocromatici con i compensatori. Tralasciando poi di fare ricerche speciali in rapporto all'acromatismo e all'aplanasia, si deve dedurre lo stato della correzione dell'aberrazione di cromaticità e sfericità, dalle prove per riconoscere il potere di definizione e di risoluzione del sistema oculo-obbiettivale.

Il *potere di definizione* consiste « nella proprietà di produrre immagini a contorni netti, ben definiti, distinti, sottili, le quali ritraggano l'eleganza e la finezza delle buone e fresche incisioni e degli stampati con caratteri nuovi su buona carta ». Quando fa difetto questa proprietà si hanno immagini a contorni sbiaditi, larghi, indefiniti, sfumati, paragonabili a quelli delle cattive incisioni, stanche, ed alle impressioni che si hanno dei caratteri vecchi sfumati o logorati dall'uso.

Per saggiare bene il potere di definizione non si possono adoperare che le lastre di prova di Abbe, cioè dischetti di argento fenestrati, fissati a vetrini portoggetti che si mettono a foco dopo aver messo al posto del diaframma un disco con due fori, uno centrale e uno laterale, opportunamente fatti, dai quali pervengono due coni luminosi nel campo microscopico. Se l'obbiettivo è perfettamente corretto, ad una data posizione del tubo, le immagini dei dischi fenestrati, corrispondenti ai due coni di luce, devono coincidere, e le striscie d'argento devono presentare bordi marcati incolori. Se la correzione è relativa, come negli obbiettivi acromatici, occorre contentarsi di vedere gli orli bleu o gialli: se sono violetti o rosa si possono tollerare a patto che le due immagini coincidano esattamente. Negli obbiettivi apocromatici va poi notato che il potere di definizione non si può estendere a tutto il campo; le due immagini, cioè, non coincidono, e ciò si deve al grande angolo di apertura che posseggono le lenti, per il quale si ha costantemente il così detto incurvamento della superficie dell'immagine.

Questo fatto però non si deve notare negli obbiettivi meno potenti dove in tutto il campo visivo, sino al margine, l'immagine deve essere appianata. Per tale ragione saggiando con le lastre di Abbe gli obbiettivi apocromatici, i bordi delle strisce d'argento appaiono incolori soltanto nel centro del campo visivo.

Il *potere risolvente* e il *penetrante* consistono nella proprietà di mettere rispettivamente in evidenza i più minuti particolari di struttura, tanto nella superficie quanto nello spessore degli oggetti esaminati. Va

da sè che gli obbiettivi non possono accoppiare un forte potere di definizione con un forte potere di penetrazione, perchè ambedue i poteri sono legati alla grandezza dell'angolo di apertura: se è ampio, maggiore è il potere di risoluzione, ciò che è utile nei forti obbiettivi; se è pic-

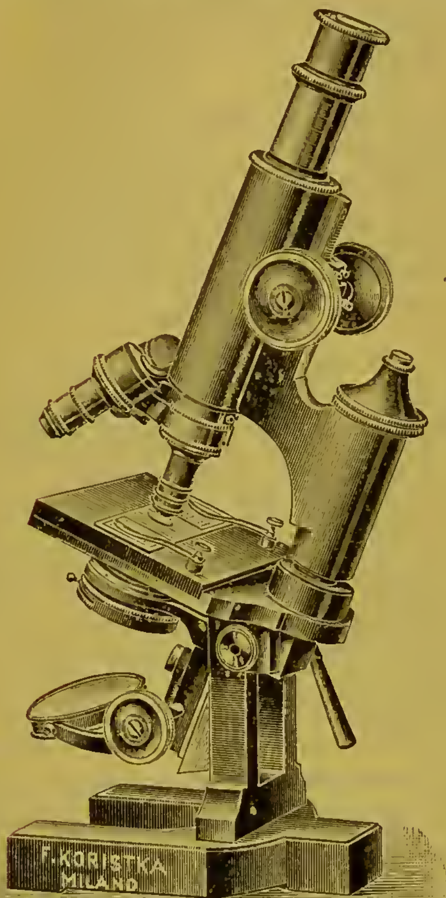


Fig. 177.

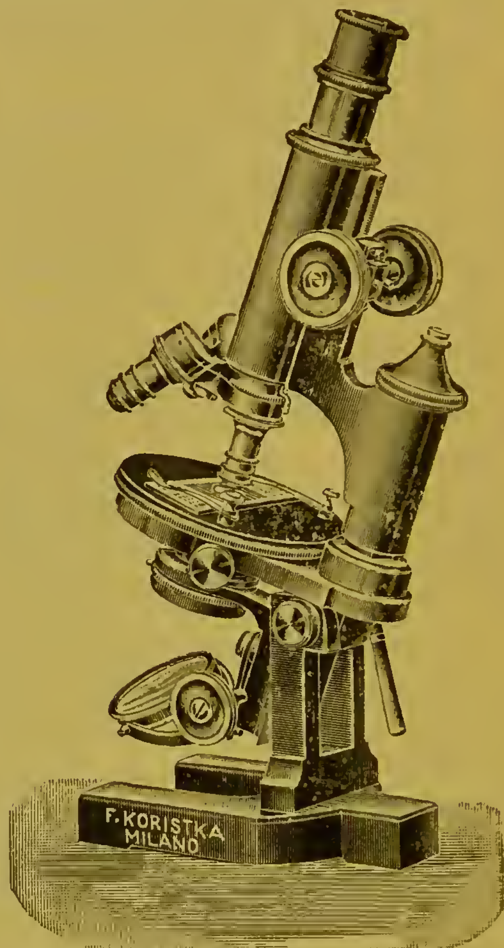


Fig. 178.

colo, maggiore è quello di definizione, ciò che è utile nei deboli obbiettivi. Nella pratica il potere risolvente si saggia per mezzo di oggetti di prova, cioè:

a) per le lenti a secco:

preparati di *Hyparchia janira*, in ciascuno degli esemplari delle quali si devono vedere delle linee trasversali, osservando ad ingrandimento di 60-150 diametri;

preparati di *Pleurosigma angulatum*, nei quali si devono vedere tre sistemi di linee a luce obliqua, osservando all'ingrandimento di 150-200 diametri, ed i medesimi a luce centrale, osservando all'ingrandimento maggiore. Sono questi generalmente gli oggetti di prova che forniscono i costruttori. Con maggiore precisione, nel *Pleurosigma*, le strie longitudinali diventano appariscenti ad illuminazione centrale all'ingrandimento di 150-200 diametri, e le trasversali cominciano a farsi visibili qua e là distintamente a quello di

300 diametri. Sono poi a questo ingrandimento distintissime ovunque adoperando la luce obliqua. Ad ingrandimenti più forti, le linee chiare si vedono in piccoli quadrelli assai distinti, ad angoli più o meno smussati, cosicchè le linee oscure che li delimitano sembrano ingrossate da rigonfiamenti più o meno simmetrici;

b) per le lenti a immersione preparati di *Surinella gemma*, in cui si deve vedere una reticella di fine linee trasversali e longitudinali interposte tra le altre linee più grosse trasversali che si partono da un'altra longitudinale;

c) sia per le lenti a secco sia per quelle a immersione, preparati di saliva che ognuno può fare lì per lì da sè, come consiglia il Bizzozzero: in questi, coi piccoli ingrandimenti di 100-120 diametri si devono vedere ben contornate e distinte, sia le grandi piastre dell'epitelio boccale, sia le piccole cellule salivari; con forti obbiettivi a secco il movimento danzante dei granuli del loro protoplasma e con gli altri obbiettivi a immersione le minutissime linee parallele e a decorso più o meno regolare, che percorrono le diverse facce delle piastre salivari.

Le combinazioni più utili per lo scopo cui può servire in microscopia e batteriologia, un microscopio, sono, riferendoci ai microscopi della casa Koristka, le seguenti:

I e II	Oculari Huygens 2 micr. 3-4 Obbiettivi a secco 2-6-8* Obbiettivo a immersione $^1/_{12}''$	L. 287.
	Stativo V con apparecchio di Abbe L. 150 o meglio stativo IV con apparecchio di Abbe L. 180.	
III. .	Oculari Huygens 2 micr. 3-4; compensatore 6 Obbiettivi a secco 2-6-8*; Obbiettivo a immersione $^1/_{15}''$ semiapocromatico	L. 337.
	Stativo IV (fig. 177) a tavolinetto rettangolare con apparecchio Abbe e revolver triplo L. 195 o lo stativo IV-*a* (fig. 178) con tavolino girevole e viti di centramento, più revolver triplo, L. 205. Sostituendo lo stativo con vite micrometrica laterale e con impugnatura, stativi III (fig. 179) e III-*a* (fig. 180) il prezzo sale per lo stativo con tavolino rettangolare (stativo III) a L. 255 e per quello con tavolino girevole (stativo III-*a*) a L. 265.	
IV. .	Oculari Huygens 2 micr. 3-4; compensatori 4-6-8 Obbiettivi a secco 2-4-6-8* Obbiettivo a immersione $^1/_{15}''$ semiapocromatico	L. 412.
	Stativo II apparecchio di Abbe e revolver triplo, L. 345, o lo stativo II-*a* con apparecchio Abbe e revolver triplo, L. 365.	

Quando poi si voglia anche fornirsi, ciò che è consigliabile, per sostituirlo ove occorra all'apparato di Abbe, del condensatore acromatico ad immersione omogenea, di fuoco mm. 5-6 e apertura num. 1.30, questo costa L. 60, più le spese per il raccordo, che variano da L. 3 per adattarlo alla guaina dell'apparato di Abbe completo degli stativi II, a L. 13 per adattarlo alla guaina dell'apparato Abbe degli stativi III, IV, V, inquantochè in quest'ultimo caso, al raccordo si unisce il diaframma ad iride (v. fig. 175).

Due parole su queste combinazioni. Per tutte si è cercato di scegliere quegli obbiettivi ed oculari che più si adattano alle ricerche microscopiche e batteriologiche, per avere immagini chiare ed ingrandimenti sufficienti. Si è preferito nelle combinazioni I e II e nella III, che è la più consigliabile, l'obbiettivo a secco 2 (che serve per la orientazione e per l'esame sintetico dei preparati) e non il 3 o il 4, perchè il 2 ha

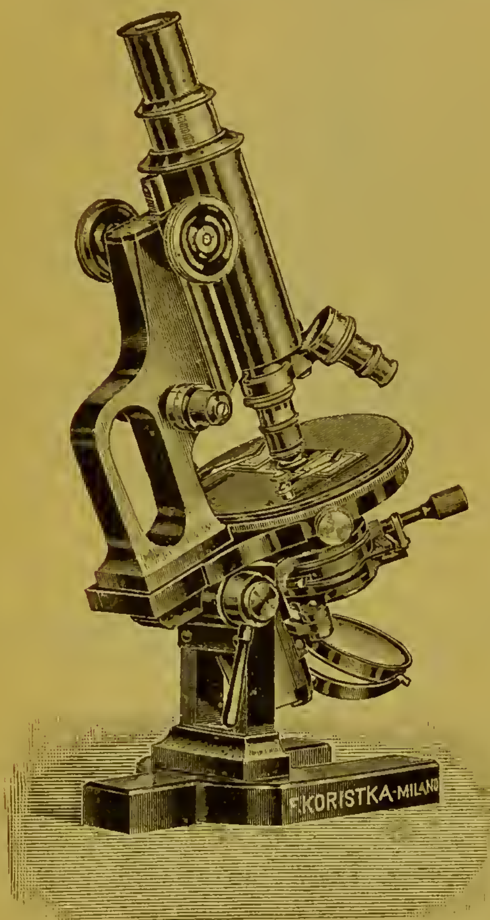


Fig. 179.

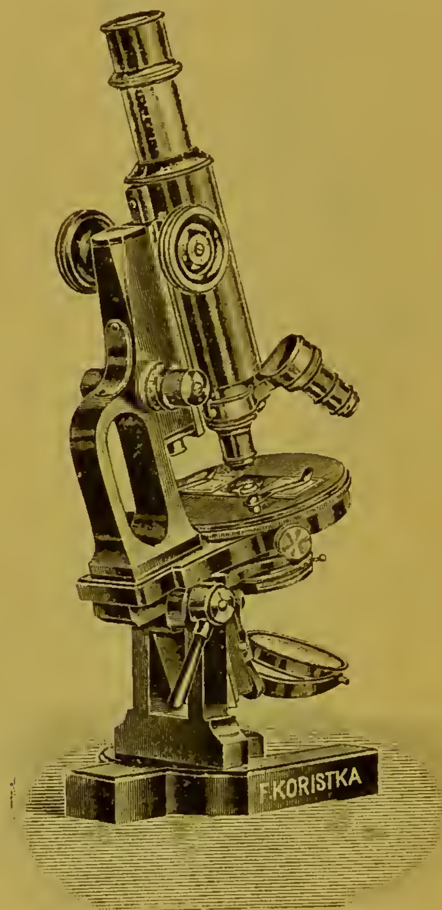


Fig. 180.

un campo visivo più grande, e una distanza focale maggiore, ragione per cui può servire per vedere oggetti chiusi in scatole di vetro (come le colonie nelle scatole di Petri), mentre col 3 il più delle volte bisogna aprirle. Si è scelto il 6 e non il 5 (1) perchè ingrandisce un po' di più, dà immagini chiarissime ed è dotato di un discreto potere di risoluzione e di un buon potere di penetrazione con una forte distanza focale, per cui anche corpi piccolissimi già si rendono visibili senza bisogno di maggiori ingrandimenti. Si è scelto l'8* e non il 9* perchè ha un campo visivo più chiaro, dà immagini ben definite, ha un forte potere risolu-

(1) L'obbiettivo a secco 5 acromatico serve bene per osservare i materiali con la illuminazione in campo oscuro. Qualora quindi si voglia fornire il microscopio di un condensatore atto alla visione in campo oscuro è bene acquistare anche quest'obbiettivo che costa L. 40.

tivo e dà ingrandimenti più che sufficienti. Del resto ove si volesse una lente che ingrandisca di più dell'8* si può ricorrere al nuovo obbiettivo del Koristka 2 mm. semiapocromatico a secco che, per certi riguardi e in vari casi, può sostituire anche l'obbiettivo a immersione omogenea.

Nella combinazione III si è, accanto ad $^1/_{15}''$ semiapocromatico, posto il compensatore 6 e non il 4 e l'8 forniti dal costruttore, perchè io ritengo che il 4 possa benissimo, atteso il debole ingrandimento che dà, essere sostituito dai comuni oculari Huygens, e l'8 ingrandisca troppo, abituando chi fa ricerche di indole pratica, a vedere gli oggetti troppo ingranditi, sicchè quando si trova ad osservarli coi comuni ingrandimenti, non ci si raccapezza più.

Del resto chi voglia avere il 4 e l'8 compensatore ed anche un obbiettivo a secco intermedio tra il 2 e il 6, può riferirsi alla IV combinazione, dove anche gli stativi sono di gran lunga preferibili agli altri.

Lo stativo V è strettamente sufficiente ai comuni bisogni: però manca del movimento in alto e in basso del condensatore ed ha una colonna meno robusta.

Lo stativo IV (fig. 177) e IV-*a* (fig. 178), offre tutte le comodità dei grandi stativi, è snodabile, ha la colonna solida, può alzarsi ed abbassarsi in esso l'apparecchio di Abbe con lo specchio e il diaframma.

Di questo tipo i nuovi modelli del Koristka presentano oramai tutte le comodità dei grandi stativi dacchè sono inclinabili ed hanno la manovella all'inclinazione, il loro tubo portalenti è diviso a mm. invece di presentare i soli segni 16 e 16 r, e tutto l'apparecchio di Abbe è spostabile dall'alto al basso per mezzo della cremagliera. Inoltre è possibile anche avere il tavolino girevole ed a viti di centramento per la traslazione micrometrica del preparato, perchè il Koristka ne fabbrica di questo stesso tipo appunto due modelli, l'uno IV (fig. 177), a tavolino rettangolare (lire 170), e l'altro IV-*a* a tavolino girevole (fig. 178), con viti di centramento (lire 180). È quest'ultimo che a mio avviso risolve il quesito propostosi dal fabbricante, di uno stativo che offra tutte le comodità senza che il suo prezzo sia elevato rispetto a quello degli altri.

Gli stativi III (fig. 180) e III-*a* (fig. 181) non sono che gli stativi IV e IV-*a* con la differenza che posseggono la vite micrometrica laterale e la impugnatura nella colonna.

Lo stativo II ha il tavolo più grande, la vite micrometrica graduata, il condensatore mobile per mezzo di cremagliera, indipendentemente dallo specchio, ecc., oltre ad altri particolari non trascurabili. Il II-*a* possiede poi anche il tavolino girevole con viti di centramento per la traslazione del preparato.

Generalmente si consiglia di fornirsi anche dei così detti apparecchi accessorî del microscopio, come del tavolino traslatore, del tavolino riscaldante, della camera lucida, del polarizzatore, del microspettroscopio. Molti di questi accessorî sono inutili. Il tavolino traslatore, per esempio, adattato

a muovere in due sensi il preparato, non serve che in casi speciali e per studi speciali e si può benissimo non abituarsi ad adoperarlo. Il tavolino riscaldante (v. questo vol. *Protozoologia*) non serve che per casi speciali e può essere sostituito il più delle volte dal termostato; consiglio ad ogni modo per chi avesse necessità di tenere i preparati sotto il campo microscopico alla temperatura di 37° C. di mettere il microscopio nella camera riscaldante di Zeiss, che è di legno, a fondo metallico, con due aperture laterali per muovere il preparato e un vetro davanti per dar luce allo specchio: la temperatura si regola eventualmente con un termoregolatore e un termometro, i quali poggiano sul tavolo portoggetti.

Necessario per il microscopista è invece il polariscopio: ma di questo apparecchio se ne parlerà più a proposito nel capitolo che riguarda l'esame delle farine.

METODI D'ILLUMINAZIONE IN CAMPO OSCURO.

In questi ultimi tempi è entrata anche nella pratica microscopica la così dettta osservazione coll' illuminazione in campo oscuro. Dapprima diretta a ricercare corpi più piccoli di quelli che fossero visibili con gli ordinari mezzi di indagine microscopica, si è poi in seguito estesa alla osservazione di elementi già ben visibili anche con gli ingrandimenti e la illuminazione in campo chiaro, onde rilevarne particolari caratteri.

I metodi ottici coi quali si cercò di mettere in evidenza particelle infinitamente piccole nei liquidi, si dissero *ultramicroscopici*. Per intenderci occorre tenere presente che la potenza risolutiva del microscopio ha un limite imposto dalla intensità, dalla direzione e dalla qualità della luce adoperata per illuminare i preparati, dal valore dell'apertura numerica dell'obbiettivo e dall'indice di refrazione del liquido che si usa per l'immersione. Nella più favorevole combinazione di questi fattori, il limite della potenza risolutiva raggiunge μ 0.16: particelle che abbiano dimensioni minori non si possono dunque discernere con l'ordinaria osservazione microscopica.

Siedentopf e Szigmondy immaginarono circa tre anni fa un espediente che permette di vedere anche particelle più piccole di μ 0.16. L'espediente consiste nell'usare come sorgente luminosa un fascio di raggi la cui direzione è normale all'asse del microscopio e invade così il piano del preparato fissato sotto l'obbiettivo: in tal modo l'occhio dell'osservatore, posto all'oculare, non può ricevere la luce diretta della sorgente luminosa; ma, se nel preparato vi sono particelle anche piccolissime, queste producono dei dischi di diffrazione e diventando, per così dire, luminose, possono essere direttamente percepite.

L'osservazione ultramicroscopica dunque non differisce dalla ordinaria microscopica che per la maniera di illuminazione, adoperandosi in generale le stesse lenti e ottenendosi quindi gli stessi ingrandimenti. Essa si fa

in una camera oscura, ed occorre una intensa sorgente luminosa data o dall'immagine del sole raccolta in un eliostato o da una lampada elettrica ad arco di circa 30 ampère. Il fascio di luce si fa passare per un obbiettivo di proiezione, poi per una fenditura orizzontale, la cui lunghezza e larghezza si possono regolare mediante due viti micrometriche, poi ancora per un altro obbiettivo microscopico condensatore, il quale concentra i raggi nel punto in cui l'asse ottico del microscopio incontra il preparato da osservarsi.

Tutti gli oggetti nominati, compreso il microscopio, sono disposti orizzontalmente sopra un banco ottico.

L'ultramicroscopio serve principalmente per l'osservazione di particelle sospese nei liquidi, siano esse inorganiche, organiche od organizzate; perciò al posto del preparato, in corrispondenza del punto focale del condensatore, subito sotto la lente obbiettiva, trovasi una vaschettina di vetro, nella quale però la faccia superiore e anteriore, fra loro perpendicolari, sono rappresentate da laminette di quarzo. Nella vaschettina si mette il liquido da osservare.

Se si esamina acqua distillata, o soluzioni saline, altri liquidi limpidi, il campo microscopico rimane oscuro; se si osservano per contrario liquidi contenenti particelle sospese, come sangue, siero di latte, brodo, ecc., allora si percepiscono tanti punti più o meno luminosi, grandi, forniti di vivacissimo movimento molecolare. Le piccolissime particelle sospese, che non si vedono coll'ordinaria osservazione microscopica, diventano visibili per la stessa ragione per cui il pulviscolo atmosferico, che comunemente non si vede, diviene subito visibile appena un fascio di luce solare penetra per un finestrino in una stanza nella quale vi è penombra o anche semplicemente luce diffusa.

Oltre all'ultramicoscopio di Siedentopf e Szigmondy, vi sono altri mezzi più semplici per l'osservazione di piccole particelle sospese, come quello di Cotton e Mouton e quello di O. Scarpa, che si sono giovati della riflessione totale della luce sulla faccia di un prisma applicato al tavolino microscopico in luogo dell'apparato di Abbe.

L'osservazione ultramicroscopica eseguita con questi mezzi si vide però che non si prestava bene per lo studio della struttura dei microrganismi; neppure poteva servire per dimostrare la presenza di germi submicroscopici, che costituiscono una parte dei così detti virus filtrabili; non essendo, come si comprende, possibile distinguerli dalle semplici particelle colloidali.

D'altro canto questi procedimenti non si mostravano molto alla mano, per poter essere largamente applicati nella pratica.

Si sono perciò escogitati altri mezzi tutti fondati sulla sostituzione all'apparecchio di Abbe di condensatori che intercettano i raggi centrali provenienti dallo specchio (fig. 181) e son fatti in modo da dirigere i raggi luminosi periferici angolarmente sul piano della preparazione, in

modo da rendere luminose le particelle che si trovano nella preparazione stessa.

Di questi condensatori ne esistono vari in commercio.



Fig. 181 (sec. Leitz).

Il *condensatore di Siedentopf* (fig. 182) della casa Zeiss e Koristka è un condensatore a superficie paraboloide: la parte centrale della sua superficie inferiore è resa opaca mediante un diaframma fisso, in modo che la luce proveniente dallo specchio piano entra solo per una corona periferica, e riflessa dalla superficie paraboloide del condensatore, va tutta a concentrarsi in un punto posto poco al disopra del piano superiore del condensatore stesso (fig. 183).

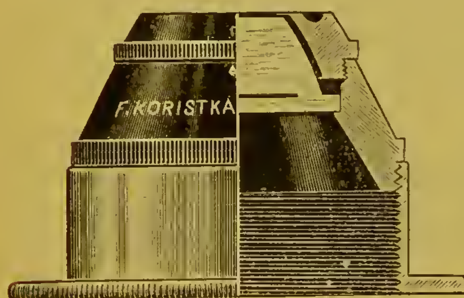


Fig. 182 (sec. Koristka).

Questo condensatore si pone nel luogo dell'apparecchio di Abbe. La preparazione va fatta su vetrini di cristallo bianco, di adatto spessore e tra vetrino portoggetti e superficie superiore del condensatore, va collocata una goccia di olio di cedro, nella quale non deve mai esservi alcuna bolla di aria.

La sorgente luminosa di solito basta sia una lampada ad incandescenza a gas a becco rovesciato o non. Tra il microscopio e la lampada va interposto un pallone sferico del diametro di 15-18 cm., che si riempie di acqua.

L'asse del pallone si deve trovare a circa 15 cm. dalla sorgente luminosa e altrettanti dallo specchio piano del microscopio (fig. 184).

Ci si regola per il giusto foco quando, messo un pezzo di carta bianca sullo specchio, si vede la immagine della retina della lampada.

La casa Reichert ha anch'essa eccellenti condensatori, alcuni dei quali sono anche adattabili al tavolino del microscopio. Chiamansi *condensatori a specchio* ed hanno il grande vantaggio di essere utilizzabili con sorgenti luminose potenti Questi condensatori consistono essenzialmente di una lente

piano-convessa da cui è tagliata via la parte mediana della curvatura. La superficie piana che così si origina è parallela alla superficie frontale della lente. Il resto della curvatura della lente stessa è argentato. Sotto il condensatore evvi uno schermo che può essere anche sostituito da altro più piccolo o più grande e che esclude dal fascio illuminante tutti i raggi la cui apertura è minore di 1.05; esso è posto proprio dinnanzi alla prima superficie piana della lente a specchio, per cui non possono mai aversi riflessi disturbatori.

Tutti i raggi che penetrano nel condensatore ed hanno un'apertura da 1.05 fino ad 1.30, subiscono alla superficie del coprioggetti una riflessione totale, per cui è completamente esclusa una penetrazione dei raggi illuminanti nell'obbiettivo dell'osservatore. L'obbiettivo può ricevere solamente quei raggi i quali entro il preparato hanno ricevuto per riflessione una deviazione dalla loro primitiva direzione, e questi raggi deviati sono quelli anche che vengono osservati nel microscopio.

I vetrini coproggetti da adoperarsi sono dello spessore di un mm., perchè a causa della corta distanza focale del condensatore la lontananza della sorgente luminosa è senza importanza e il preparato deve esser sempre egualmente distante dalla seconda superficie piana del condensatore.

Come sorgente luminosa si può adoperare una lampada a gas ad incandescenza; ma è meglio una lampada Nernst.

Tra la sorgente luminosa e il microscopio va posta una lente con relativo schermo.

Tra i vari condensatori a specchio Reichert, il più pratico è quello a lastra con diaframma a revolver *Fb*, da applicarsi su qualunque tavolino di microscopio, quadrato o rotondo (fig. 185). Il diaframma a revolver ha lo scopo di modificare convenientemente il cono luminoso per immersioni ad olio ed obbiettivi a secco, e d'altro lato di permettere una comoda regolazione della luce per differenti sorgenti luminose e di facilitare il passaggio della illuminazione dal campo oscuro alla usuale. Costa lire 105.

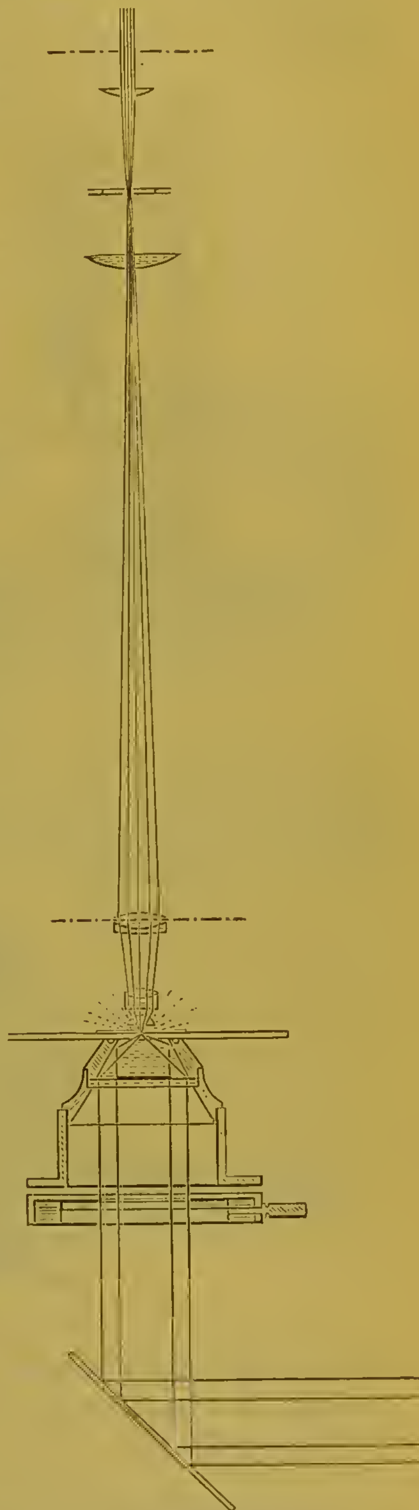


Fig. 183 (sec. Koristka).

La casa Leitz ha anch'essa messo in commercio dei *condensatori per l'illuminazione in campo oscuro*.

Uno molto semplice centrabile è dato dal così detto diaframma per il campo oscuro *A*, n. 95: un altro molto perfezionato è il così detto condensatore a specchio *A*, *B* e *C*, di cui il *B* è applicabile sul tavolino

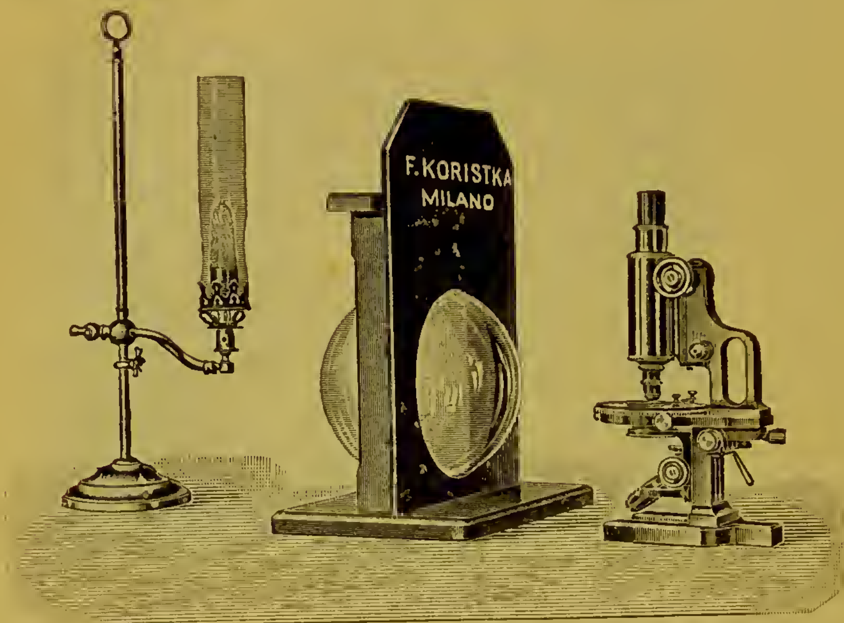


Fig. 184 (sec. Koristka).

del microscopio, gli altri due nella guaina dell'apparecchio di Abbe. Quello *C* è il più perfezionato (fig. 186): esso permette di sostituire l'illuminazione in campo oscuro con quella in campo chiaro quando si voglia.

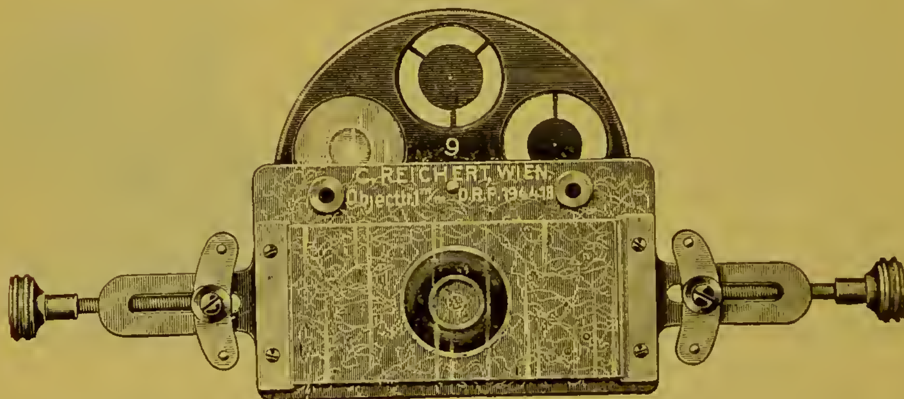


Fig. 185.

Anche la casa Zeiss costruisce ora di tali condensatori perfezionati (condensatori aplanatici a campo oscuro): sono specchi sferocardioidi che posseggono una luminosità grandissima.

Faccio notare che l'illuminazione in campo oscuro si può anche ottenere diaframmando l'apparecchio di Abbe tra le due lenti, come ha fatto il Volpino, oppure scalottando la lentina superiore del condensatore acromatico di Koristka, come ho fatto io, ed in altri modi.

Inoltre è da aggiungere, che qualunque sia il metodo usato per ottenere l'illuminazione in campo oscuro, si possono usare anche lenti ad immersione

purchè siano diaframmate, introducendo dentro la montatura adatto diaframma tubulare o ad imbuto.

L'applicazione di un diaframma tubulare si rende anche necessario quando si adoperano obbiettivi a secco a corto fuoco.

Caso per caso e lente per lente, essi vanno studiati in relazione anche al condensatore che si vuole adoperare.

Come obbiettivi a secco si possono usare gli ordinari obbiettivi acromatici, il 5 di Koristka si presta bene: però è sempre preferibile ricorrere agli apocromatici.

Quanto agli oculari, vanno sempre adoperati quelli compensatori, con le lenti a secco, dando la preferenza al 12 e al 18; con le immersioni ad olio di cedro al 6 ed 8, salvo a ricorrere al 18 e 12 quando ve ne sia bisogno.

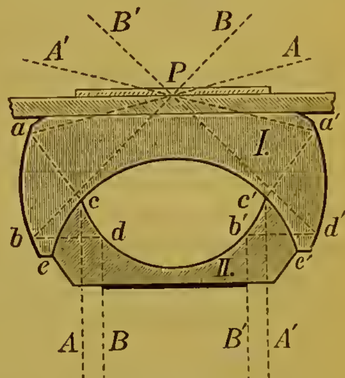


Fig. 186.

Ecco del resto un esempio del dispositivo ottico cui si può ricorrere a seconda degli ingrandimenti che si vogliono ottenere e dei condensatori che si vogliono adoperare, come consta alla mia esperienza:

1. *Dispositivo di orientamento o ricercatore*, consistente nell' uso del condensatore, di poco importa qual casa, per l'illuminazione in campo oscuro e dell'obbiettivo 8 apocromatico a secco con l'oculare 12 o 18, compensatore = ingrandimento 375-562 diametri.

2. *Dispositivo per l'esame dei dettagli*, consistente nell'uso del condensatore e: 1° delle lenti a secco 4 e 3 mm. apocromatico opportunamente ed a seconda del condensatore diaframmate (per il condensatore Siedentopf, per quello Reichert *Fa*, p. es., con diaframma endo-obbiettivale, foro di mm. 5.5) = ingrandimento con il 12 o 18 compensatore, rispettivamente di 750-1000 diametri e di 1000 e 1500 diametri; 2° delle lenti ad immersione diaframmate (p. es., il $^1/_{15}$″ semiapocromatico Koristka con diaframma endobbiettivale di 2 mm. di foro) con le quali, a seconda dell'oculare che si adopera, si possono raggiungere e sorpassare i 1000 e i 2500 diametri.

Oltre ai microscopi qui elencati ve ne sono poi altri che servono a scopi speciali. Così evvi un microscopio compressore per mettere in chiaro i focolai trichinosi nelle carni, un microscopio per dilacerare i pezzi a piccoli ingrandimenti, microscopi per dimostrazione di molti preparati, ecc., ecc.

ESAME MICROSCOPICO DELLE CARNI FRESCHE E CONSERVATE E DEL GRASSO.

Carni.

L'esame microscopico della carne, dal punto di vista igienico, si pratica per rispondere ai seguenti quesiti:

a quale animale appartenga;
se provenga da animali affetti da malattie infettive;
se sia invasa da parassiti animali;

se vi si trovino commiste sostanze estranee;
se sia fresca, frolla, putrefatta, ammuffita, colorata.

1. ESAME MICROSCOPICO PER RICONOSCERE A QUALE ANIMALE APPARTENGA LA CARNE IN ESAME. — Pochi si sono occupati di stabilire differenze fra le carni dei diversi animali che vengono macellati. Qualche ricerca è stata fatta soltanto sulle fibre muscolari striate e sulla grandezza delle cellule adipose; ma essa è bastata per convincere della poca importanza pratica dell'esame istologico, specialmente quando si tratta di differenziare la carne di animali affini.

Riferiamo, per darne un'idea, gli esami istologici comparativi fatti allo scopo dallo Stazi sulla carne di bovini, equini, suini, caprini ed ovini.

BOVINI. - *Vitello.* — Fibre piuttosto piccole; striature trasversali sottilissime; nuclei numerosi, grossi a paragone della fibra, situati, tanto ai lati di questa, quanto lungo la linea mediana (secondo Zoccoli e Nosotti, sono posti di preferenza nell'interno; secondo Savarese, occupano il centro; secondo Stazi di solito si trovano ai margini). Cellule adipose, alquanto ovali, con diametri minori di quelle di bue e e di vacca (Nosotti).

Giovenco. — Fibre più grandi di quelle di vitello; striature trasversali alquanto più grosse; nuclei ovali, ma non molto allungati, abbastanza numerosi, salvo in alcune fibre che ne hanno pochi. Cellule adipose tendenti alla forma ovale, come del resto in tutti i bovini.

Bue. — Fibre in generale più sviluppate delle precedenti; striature trasversali ancora più spesse; nuclei grossi, ovali, molto allungati su tutta la faccia interna del sarcolemma. Cellule adipose più grandi di quelle degli altri animali da macello.

Vacca. — Fibre quasi identiche per dimensioni a quelle del bue e così pure le striature trasversali; nuclei grossi e numerosi. Cellule adipose poco più piccole di quelle del bue.

Toro. — Fibre quasi tutte sviluppate quanto quelle di bue, salvo qualcuna, rara, che è più piccola; striatura trasversale grossa e marcata; nuclei come corpiccioli ovali, quasi rotondi, ed altri anche più allungati, tutti nella direzione longitudinale della fibra, di varia grandezza, non molto numerosi, di forma svariata, cioè, dall'ovale molto allungato alla forma quasi rotonda.

BUFALINI. - *Vitello.* — Fibre di grandezza intermedia tra il vitello bovino e il bovino adulto; striature trasversali più marcate di quelle di un bovino in pari condizioni di età; nuclei grossi, poco numerosi e in maggioranza ai lati della fibra.

Giovenco. — Fibre poco più grosse di quelle di giovenco bovino; striature trasversali più marcate e visibili; nuclei alcuni più piccoli di quelli di vitello bufalino, altri più grossi, ma assai più numerosi, di forma molto allungata.

Bufalo. — Fibre bene sviluppate, meno trasparenti di quelle di bue, con le striature trasversali più marcate: nuclei, in alcune fibre più numerosi e in altre meno, di forma diversa, alcuni molto allungati, altri ovali, altri quasi rotondi. Cellule adipose di forma poligonale.

Equini - *Cavallo.* — Fibre abbastanza grosse, ma generalmente meno che nei bovini e bufalini, con bellissima striatura trasversale somigliante a quella delle fibre bufaline. Da alcuni non si tiene affatto parola intorno ai nuclei e da altri se ne nega addirittura la presenza, però trattando opportunamente la fibra, essi rendonsi appariscenti nè più nè meno che quelli delle altre fibre, alcuni più grossi, altri più piccoli, tutti allungati. Le cellule adipose hanno una forma più decisamente ovale, ma sono meno sviluppate di quelle dei bovini e bufalini.

Asino. — Fibre sviluppate forse quanto quelle di cavallo con piccoli nuclei, i più piccoli fra quelli delle carni finora descritte.

Suini. — Fibre uguali o poco più grosse di quelle di bovino adulto; striature trasversali grossolane; nuclei più numerosi in alcune fibre, in altre meno, alcuni ovali allungati, altri pure allungati, ma rotondi ad una estremità ed a punta nell'altra. Cellule adipose generalmente di forma poligonale; esse si trovano ad ammassi su alcune fibre.

Caprini - Ovini. — Fibre sottili forse quanto quelle di vitello di poche settimane: striature trasversali finissime, ma molto bene visibili; nuclei grossi, alcuni di forma uguale a quelli delle altre fibre, altri o rotondi o triangolari.

I trattatisti poi, limitando la *diagnosi differenziale tra carne bovina, equina* e *suina*, ritengono che, fino a un certo punto, queste carni si possano distinguere:

a) in base al numero dei nuclei, allo spessore degli strati e allo spessore totale delle fibre muscolari striate, perchè:

quelle dei bovini sono ricche di nuclei e presentano una striatura abbastanza delicata e uno spessore che è inferiore a quello delle altre;

quelle degli equini sono povere di nuclei e presentano striature un po' grossolane e uno spessore maggiore;

quelle dei suini sono povere di nuclei, posseggono una striatura grossolana e uno spessore maggiore di quello di tutte le carni degli animali da macello;

b) in base alla grandezza delle cellule adipose, perchè:

le cellule adipose dei bovini sono molto grandi, anzi le più grandi di tutte, fra quelle degli animali da macello;

le cellule adipose degli equini sono le più piccole fra tutte (media μ 35);

le cellule adipose dei suini sono più piccole di quelle dei bovini, ma più grandi di quelle degli ovini (media μ 60).

Soltanto, recentemente, per differenziare una carne dall'altra si è pensato di mettere a profitto il metodo sierodiagnostico.

Il Rigler ha infatti trovato che i sieri dei conigli, trattati con lo estratto acquoso di una data specie di carne, dànno un precipitato o per lo meno un intorbidamento quando ad essi si aggiunge una certa quantità dell'estratto stesso, mentre non dànno la detta reazione quando

si aggiungano estratti di carne di specie diversa da quella adoperata per le iniezioni. La reazione avviene tanto se l'estratto è fatto con carne cruda, quanto se fatto con carne bollita o arrostita. Se si tratta di un miscuglio di più estratti, la reazione si ha solo quando si aggiungano ai sieri estratti identici a quelli adoperati. Così il Rigler avrebbe diagnosticate le carni di coniglio, di capriolo, lepre, cavallo, vacca, porco, gatto.

Secondo Miessner ed Herbst il succo deve essere preparato: se con carne fresca, nel rapporto di 1 di carne e 50 di soluzione fisiologica di cloruro di sodio, se con carne salata nel rapporto di 1 a 25. Si può anche adoperare la soluzione di cloruro sodico coll'aggiunta di 0.5 % di acido fenico.

2. Esame microscopico per riconoscere se la carne appartenga ad animali affetti da malattie infettive. — La provenienza delle carni da animali infetti non si può dimostrare che coll'aiuto della batteriologia.

Quando si tratti di carni fresche, si preleva con ansa di platino sterilizzata, o il sangue del cuore, della milza, della muscolatura e ove occorra delle vene, o il materiale che si trova nei focolai in cui ha sede la malattia (v. anche a pag. 662 del Vol. I).

Quindi si allestisce un preparato che si colora con la miscela dello Ziehl o dell'Ehrlich o col metodo del Gram a seconda dei casi (v. *Batteriologia*).

Si possono anche fare preparati dalla superficie di taglio degli organi, e perciò occorre fornirsi di vetrini portoggetti sterilizzati direttamente alla fiamma, disporne alcuni sul tavolo sopra carta bibula, prenderne un altro per un lato stringendolo fra il pollice e l'indice e poi imbrattarne il bordo tagliente sulla superficie di taglio; indi lo stesso bordo imbrattato si striscia sopra alcuni dei portoggetti posti sul tavolo. Si ottengono così dei preparati in cui il materiale è posto in unico strato sottile, che si essicca e si colora.

Quando poi si abbia a che fare con pezzi di tessuti che non si spappolano facilmente, è consigliabile porli in capsule Petri, tagliuzzarli con una forbice curva senza togliere del tutto il coperchio della capsula e poi prenderne una certa quantità con un robusto ago di platino, porla sopra un vetrino portoggetti sterilizzato e schiacciare la poltiglia con un altro vetrino che si toglie via per strisciamento.

Se invece si debbono praticare queste ricerche su carni conservate, occorre strofinare pezzetti di esse sopra portoggetti puliti, lasciare seccare il materiale, sgrassarlo ove occorra con etere, e colorare con gli stessi liquidi già indicati. È però impossibile, generalmente, venire a una diagnosi esatta senza ricerche colturali e prove sugli animali.

Se si tratta di *pioemie*, quando siano prodotte da stafilococchi, si ricercheranno questi germi possibilmente nei focolai osteomielitici, che difficilmente mancano; quando invece siano prodotte da streptococchi, si ricercheranno preferibilmente nelle localizzazioni dei vari organi. La loro diagnosi è, in via generale, facile: basta per gli stafilococchi riconoscere cocchi disposti ad ammassi, per gli streptococchi disposti a ca-

tena di rosario: da un semplice preparato, però, è impossibile riconoscere la specie cui questi germi appartengono.

Se le pioemie sono prodotte da altri batteri, poichè non è detto che tutte siano prodotte da cocchi, in tali casi, senza la prova colturale e la prova biologica, è impossibile giungere ad una diagnosi.

Se si tratta di *setticoemie*, alla ricerca microscopica si è data da molti poca importanza, perchè v'è chi ancora ritiene che la setticemia sia dovuta soltanto ai prodotti settici assorbiti e penetrati nel torrente circolatorio, cioè a quei materiali che con parola impropria sono detti tossine della putrefazione. Ma dal momento che queste forme di setticemia, tutte le volte che si sottomettono a studio dal batteriologo, si vedono trarre la loro origine da batteri, è evidente che la ricerca microscopica si deve fare anche in queste affezioni per trovarne gli agenti causali: soltanto non tutte le etiologie delle diverse setticemie sono note o ben sicure.

I bovini, e più raramente gli equini e i suini possono essere affetti da *carbonchio ematico*. Si troveranno: un edema gelatinoso, sottocutaneo, le carni pallide, così dette lessate, la milza grande, nerastra, spappolabile, il sangue piceo. In tutti gli organi si troveranno bacilli lunghi e grossi (μ 3-6-10), con gli estremi che nei preparati fissati e colorati appaiono tagliati nettamente quando sono riuniti a catena, con uno spazio ovoide tra di loro, per cui le estremità appaiono leggermente concave; questi germi sono immobili e appaiono per lo più nei tessuti forniti di una capsula, e sono colorabili col metodo del Gram.

I bovini, gli ovini ed i caprini possono essere affetti da *carbonchio sintomatico*. Si troverà in una regione muscolare una tumescenza crepitante al tatto, coperta di pelle generalmente necrosata, contenente un liquido siero-sanguinolento; la massa muscolare rosso-bruna infiltrata del liquido stesso e intramezzata da bolle di gas; versamenti nelle cavità, e la milza ingrandita, rossastra. Facendo preparati dal liquido sottocutaneo, dal succo dei muscoli, dalla polpa della milza, si troveranno forme bacillari simili a quelle del carbonchio ematico, ma in massima più corte e più sottili (μ 1 × 5-8). Quelle osservate nel succo dei muscoli sono però modificate nella loro forma, avendo assunto l'aspetto di bacchette da tamburo o di fuso per la presenza di spore nel loro interno. Sono bacilli per lo più isolati, che non resistono al metodo del Gram tipico: rimangono però colorati in viola, ove all'alcool si sostituisca l'olio di anilina e non si pratichi la colorazione di contrasto.

Gli equini, e anche gli altri animali che forniscono carne mangereccia (eccezionalmente nei bovini) si possono trovare affetti da *edema maligno*. In questi casi si nota un edema sottocutaneo qualche volta crepitante, siero-sanguinolento, diffuso, congestione di tutti gli organi e quindi anche della milza e la muscolatura di un colorito rosso vinoso, fucsinata, come impropriamente si dice. Nella milza, nel liquido sotto-

cutaneo, ed eccezionalmente soltanto, nel sangue, si troveranno bacilli più corti e più sottili di quelli del carbonchio ematico (μ 1 × 3), a estremità arrotondate, isolati o riuniti a filamenti (lunghi sino a 15-40 μ) immobili o quasi, mentre sono mobili le forme corte, non colorabili, secondo la maggioranza degli autori, col metodo del Gram.

I bovini adulti possono poi essere affetti dalle così dette *setticemie emorragiche*, dalla *febbre catarrale maligna*, dal *tifo*, ecc.; i vitelli dalla *difterite*, dalla *diarrea bianca*, ecc.; i bufali dal *barbone bufalino;* gli ovini dalla *mastite cancrenosa*, dalla *polmonite verminosa;* i suini dal *mal rosso*, dalla *setticemia dei suini*, dalla *peste* o *colera;* i polli dalla *difterite*, dal *colera*, dalla *peste* (v. anche *Ispez. delle carni*, Vol. I).

Queste setticemie emorragiche sono in genere provocate da un batterio, cosidetto ovoide per la sua forma, che presenta la caratteristica di colorarsi più intensamente alle estremità polari, che nella parte centrale.

Per riconoscere questo germe nei tessuti, mercè l'osservazione microscopica, il metodo migliore è la colorazione del materiale in esame col bleu di toluidina fenica, secondo la formula di Bordet, colorazione che permette di differenziare nettamente il *Batterio ovoide*, da altri germi che con esso potrebbero confondersi, come il *B. coli di Escherich*.

Per la ricerca e la diagnosi degli agenti etiologici di queste malattie, vale ben poco il semplice esame microscopico.

Quando invece si tratti di infezioni da batteri che tendono a localizzarsi negli organi, allora potrà trattarsi di *tubercolosi*, di *actinomicosi*, di *farcino* nei bovini, di *tubercolosi* e di *difterite* negli uccelli, di *morva* e di *tetano* negli equini.

Se si tratta di *tubercolosi* nei bovini si troveranno bacilli diritti o un po' curvi, sottili e lunghi (μ 0.3 - 0.5 × 3 5), colorabili coi metodi di colorazione dei bacilli della tubercolosi, nei polmoni, o nei gangli linfatici (nei noduli meno caseificati) o nel muco bronchiale. Quando invece si tratti di tubercolosi nei polli, la ricerca va specialmente fatta nel fegato, nei gangli mesenterici, nella milza e i polmoni vanno esclusi.

In ogni caso se occorre poi esaminare il contenuto intestinale, specie di bovini, bisogna ricordare che nelle feci delle vacche, normalmente, si trova un bacillo, il così detto *Mistbacillus* di Möller, che assomiglia al bacillo della tubercolosi e si colora nello stesso modo.

Ma il *Mistbacillus* di Möller non è il solo germe acido-resistente frequente a trovarsi nei bovini.

Ne furono descritti, infatti, degli altri tanto che questi germi acido-resistenti furono distinti in due sottogruppi a seconda che si trovano negli animali sani e loro escrementi e negli ammalati.

Si fa però solo menzione di quello di Möller perchè il più studiato essendosi potuto isolare, coltivare e inoculare.

E ancora bisogna aver cura di non confondere, fondandosi sulla sola colorazione dei batteri, con focolai di tubercolosi, quelli che sono di

pseudo-tubercolosi, alcuni dei quali contengono batteri generalmente corti e grossi, ammassati e facilmente coltivabili.

Se poi si tratta di carni affette da *Actinomyces* si noterà la presenza di tumori duri di aspetto lardaceo (specialmente nel mascellare inferiore dei bovini) con punti suppurati contenenti corpi bianco-grigiastri o giallastri che, trattati con acido acetico al 5 % e dilacerati, si presentano costituiti da masse filamentose i cui elementi alla periferia hanno aspetto di clave o pere, colorabili coi comuni colori anilinici e dimostrabili anche nelle sezioni col metodo di Weigert.

Se si tratta di *farcino bovino* in corrispondenza delle estremità degli arti si troveranno, lungo il decorso dei linfatici, dei cordoni duri ed indolenti, nel cui contenuto, in mezzo a dei focolai di rammollimento, si troveranno dei filamenti ramificati e variamente intrecciati, che stanno a dimostrare la natura streptotricea dell'affezione.

Se si tratta di *morva* si noterà la presenza dei noduli mocciosi e nel sangue quella di bacilli un po' più spessi dei bacilli tubercolari, a estremità arrotondate, generalmente non omogeneamente colorabili, vacuolati, come si dice, o a navicella, isolati o a due, mobili qualche volta, non colorabili coi metodi di colorazione specifica dei bacilli tubercolari e neppure col metodo del Gram.

Se si tratta di *difterite dei polli*, si troveranno in corrispondenza della base della lingua delle membrane bianco-sporche, le quali esaminate al microscopio, col metodo del Neisser, si dimostrano contenere un batterio che presenta dei granuli metacromatici. Questi particolari hanno fatto credere che la etiologia dell'infezione fosse legata ad un batterio difterico. Recentemente però si è potuto assodare che essa è causata da un virus filtrabile.

Più comune è il *B. colerae gallinarum*, ma è stata descritta anche una forma di *B. coli* e recentemente un germe detto *B. pseudocolerae gallinarum.*

Se si tratta di *tetano* nel solo sito d'inoculazione (nella ferita, anzi, quando essa sia rinvenibile) si troverà una leggiera chiazza emorragica con germi sottili e diritti, generalmente isolati, di rado riuniti a filamenti, resistenti al Gram, mobili, forniti (pare solo se la ferita è aperta) di una spora terminale, che dà loro l'aspetto di bacchetta di tamburo. Nessun organo presenta, microscopicamente, delle alterazioni; nè in essi, nè nel sangue sono visibili dei germi.

Se si tratta di carni equine affette da *botriomicosi* si noteranno dei noduli duri bianco-giallicci, come granelli di sabbia circondati da una guaina comune, contenenti corpi di grandezza varia, disposti a grappolo, grandi da 5 a 100 μ che risultano dalla riunione di forme cocciche, le quali sarebbero anche state coltivate. Indubbiamente sono formazioni parassitarie e il parassita è stato chiamato *Discomyces equi* dal Rivolta

o *Botryomyces equi:* però la denominazione più comune è quella di *Micr. ascoformans* datagli da Johne e Robe.

Secondo Kitt sembra si tratti di un germe simile allo stafilococco aureo. Però non solo non è ben sicura la sua parentela con lo stafilococco piogeno aureo, ma, a mio vedere, neppure quella coi cocchi checchè sia stato scritto sul proposito. Difatti alcuni autori lo collocano nell'anello di passaggio fra i batteri ed il gruppo degli *Streptothrix*, che hanno ben altra forma di quella dei cocchi e che sono delle individualità batteriche note ormai per tutt'altri particolari.

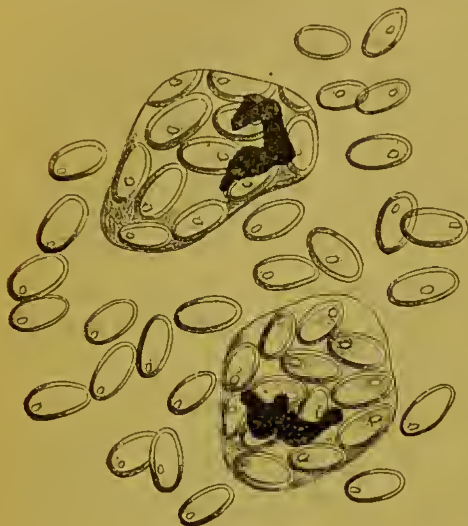


Fig. 187.

Se si tratta di carni affette da *blastomiceti*, ricorderò solo, nel caso si tratti di carne equina, che, se nel pus delle ghiandole si trovano dei corpi ovoidali un po' acuminati ai poli, contenenti spesso un granulo splendente (fig. 187), si tratta di *farcino criptococcico*. Questi corpicciuoli sono stati riferiti a blastomiceti, non solo per la loro forma ovoide (si sa che vi sono di tali blastomiceti), ma anche perchè sarebbe stato coltivato dai noduli un blastomiceta, che nel cavallo avrebbe prodotto noduli consimili, con esito alla formazione di un pus denso, analogo a quello del farcino criptococcico. Noi però non abbiamo mai potuto veder gemmare alcuno di questi corpicciuoli, nè abbiamo trovato in essi le caratteristiche microchimiche dei blastomiceti, e dal materiale farcinico ricco di tali corpuscoli non abbiamo potuto isolare in alcun terreno speciale forme blastomicetiche (Casagrandi e Adami). Secondo le recenti ricerche del Gasperini si tratterebbe infatti di una affezione prodotta da un mixosporidio.

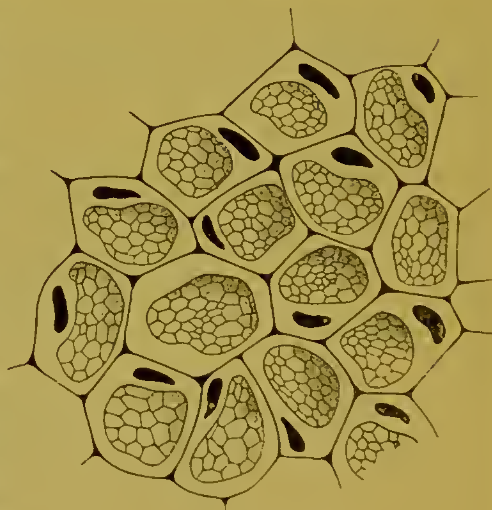


Fig. 188.

Nel caso si tratti di volatili e si notino sulla cresta, sul collo, attorno all'arco sulle palpebre, nella faccia interna delle zampe dei noduli solidi che, schiacciati, lascino fuoriuscire un contenuto formato di corpi ovali o rotondeggianti, un po' splendenti, a contenuto omogeneo, come raggrinzato (fig. 188), si dovrà invece parlare di vaiuolo dei polli.

Un'affezione identica si può produrre microscopicamente (Casagrandi) e macroscopicamente (Sanfelice) con un blastomiceta.

Secondo Marx e Sticker, l'epitelioma contagioso dei polli, che si fa sinonimo di vaiolo dei polli, sarebbe invece dovuto ad un virus che passerebbe attraverso le candele di Berkefeld (v. *Protozoologia, Germi ultramicroscopici*).

Le carni possono, e specialmente le carni in conserva, contenere dei germi, che introdotti coll' alimentazione nell'organismo, dànno luogo ai cosidetti *avvelenamenti per carne* (v. anche *Ispezione delle carni*, Vol. I).

Questi germi più frequentemente sono il *B. enteritidis* di Gärtner e il *B. botulinus* di Von Ermengen: il primo trovasi più spesso nelle carni dei bovini, equini, suini, ovini sia fresche, sia confezionate in vario modo, cotte o insaccate, il secondo più di frequente nelle carni insaccate.

Frequenti pure a trovarsi nelle carni ed essere causa di avvelenamenti alimentari sono i seguenti batteri: *B. paratifo* di Schottmüller, *B. morbificans bovis* di Basenau, *B. della pneumoenterite dei suini* di Salmon-Smith, *B. della dissenteria dei vitelli* di Thomassen, *B. della setticoemia dei vitelli* di Malvoz, *B. della dissenteria dei vitelli* di Jensen, il *B. foecalis alcaligenes*.

Se trattasi del *B. enteritidis* o di germi affini, coll'osservazione microscopica si riscontrano nelle carni dei bastoncini, corti e tozzi, non prendenti il Gram: se dal *B. botulinus* di Von Ermengen, dei bastoncini, con spore terminali.

Ma nell'un caso e nell'altro la sola osservazione microscopica non è sufficiente per la diagnosi, ma è necessario sempre adire a delle opportune indagini batteriologiche.

Oltre il *B. di Gärtner* e germi affini ed oltre il *B. botulinus* si descrivono come causa di avvelenamento per carne: germi del gruppo dei Protei; germi del gruppo del *B. del colon;* lo *Stafilococco piogeno aureo*; il *B. piocianeo;* il *B. del carbonchio;* e germi svariati non ancora bene classificati.

Non è ancora stabilito se avvelenamenti alimentari possono essere dati da carni provenienti da animali ammalati di infezione a virus ancora sconosciuti, da animali con carni tossiche spontaneamente (*Petromizon marinus*), oppure uccisi dopo un lungo affaticamento e coi tessuti contenenti prodotti anormali o per qualità o per quantità del ricambio materiale.

Si sa però con certezza che pesci molluschi e crostacei possono essere veicolo di germi infettivi. Sotto questo riguardo sono state particolarmente studiate le ostriche nelle quali sono stati trovati il *B. del tifo*. il *B. coli*, germi appartenenti al gruppo degli aerogeni e recentemente un germe appartenente al grande gruppo tifo-coli e vicino al *B. colerae suum* e *B. tiphi murium* (Vivaldi). Si è anche insistito su di una forma infettiva speciale di ostriche cui si è dato il nome di febbre tifoide da ostriche dal Carrien. Per la diagnosi l'esame microscopico dell'acqua delle valve e del canale intestinale non è sufficiente. Occorre la ricerca batteriologica corredata di tutti i mezzi più fini capaci di condurre ad un orientamento (v. *Batteriologia*)

3. Esame microscopico per riconoscere se la carne sia invasa da parassiti animali (1). — Nelle carni possono trovarsi cisticerchi, cisti, larve, vermi adulti, sarcosporidi, ecc.

(1) V. per maggiori dettagli la parte di questo trattato che si riferisce alla *Parassitologia*, dove si troveranno anche le figure dei singoli parassiti, nonchè la parte riguardante l'ispezione delle carni, nello stesso volume.

a) *Carni con cisticerchi.* — Le carni con cisticerchi sono di suini, di bovini, ecc.

Se si tratta di carni suine fresche, la diagnosi si fa esaminando i muscoli sopra o sotto-scapolari, cervicali, femorali, sotto-lombari, la lingua e il cuore (ciò che non esclude che i cisticerchi si possano trovare in altri organi, nelle sierose, nel fegato, nella milza, ecc.). Ritrovando quivi dei corpicciuoli ovalari piuttosto duri, bianco-sporchi, pressochè della grandezza di un piccolo fagiuolo (mm. 6 a 20 × mm. 5 a 10), si estraggano, tagliando con un bisturi la capsula connettivale da cui sono circondati, si pongano sopra un vetrino portoggetti in una goccia di glicerina, si coprano con un altro portoggetti e si schiaccino.

Se si tratta di carni bovine fresche, osservando il cuore, la lingua, i masseteri, i muscoli del laringe, si troveranno delle vescicole di forma allungata, lunghe 5-8 mm., larghe 3 mm., presentanti nell'equatore una macchia bianco-giallastra. Si estraggano allora queste vescicole e si sottomettano all'esame microscopico, schiacciandoli ugualmente tra due vetri portoggetti in una goccia di glicerina: si troveranno le teste svaginate del verme, nel primo caso con uncini, quindi di *Taenia solium*, nel secondo senza uncini, quindi di *Taenia mediocanellata.*

Se si tratta di carni conservate si può procedere con il metodo di Riessling più o meno modificato.

A tal uopo si prende della soda o potassa caustica la cui densità segni al densimetro di Baumé 19° corrispondenti presso a poco a 1.15 di peso specifico, oppure, non avendo il densimetro, si sgrassa la carne con etere e si prepara una soluzione concentrata alcalina così fatta che introducendovi in essa la carne, questa galleggi. In circa 300 cmc. di liquido, posto in una boccia a collo largo e a tappo smerigliato, si fa pervenire una certa quantità di carne (che se è molto grassa si tratta precedentemente con etere), tagliuzzata finamente e si sbatte bene sino ad ottenere una poltiglia, il più possibilmente omogenea. D'altro canto si versa in un bicchiere a calice, di circa un litro o più, della soluzione alcalina e in essa si versa la poltiglia ottenuta, si agita alquanto e si lascia a sè. In breve tempo al fondo si depositano i cisticerchi, mentre la carne rimane galleggiante. Si decanta allora il materiale e si esamina ciò che va al fondo schiacciandolo, in una goccia di glicerina, fra due vetri portoggetti.

Si può anche digerire la carne in pepsina idroclorica a 40° per varie ore: il grasso dopo questo trattamento rimane a galla; i cisticerchi intaccati solo nelle loro pareti, vanno a fondo; la carne viene digerita: è questo il procedimento di Schmidt-Mühleim.

b) *Carni con cisti.* — Le carni con cisti appartengono ai più diversi animali: possiamo trovare fra di esse quelle con cisti di echinococco e con cenuri.

La diagnosi di cisti da echinococco, indipendentemente dai dati macroscopici, che grandemente la facilitano e la rendono il più delle volte

indubbia, è possibile mediante l'esame microscopico. Se entro la cisti, sulla sua parete interna, si trovano i *cistinidi* o *vescicole germinative* basterà distaccare pezzetti della parete cistica in corrispondenza di questi bottoni ed osservarli al solito in una goccia di glicerina, debitamente schiacciati fra due vetrini portoggetti Si vedrà allora che ogni *cistinido* è costituito da 1 a 20 e più scolici o teste con 4 ventose, un rostello ed una corona di uncini.

Se invece entro la cisti, dalla stato germinativo interno della medesima, non si sono originate le *cistinidi*, è sempre possibile far la diagnosi di cisti da echinococco prendendo in considerazione la struttura della membrana della cisti, che si presenta in ogni caso multistratificata, cioè come se fosse costituita da una serie di lamelle sottili, amorfe disposte concentricamente.

c) *Carni con larve di vermi.*

Se si tratta di suini, si possono ritrovare nei muscoli dei medesimi le larve della *Trichina spiralis.*

La presenza di questo verme si dimostra, tanto nelle carni fresche che conservate, per la presenza di puntini biancastri fra le fibre muscolari, rappresentati da una cisti fusiforme della grandezza di μ 40 × mm. 0.30-0.80, nel cui interno si trova il vermiciattolo ripiegato a spira e della lunghezza di circa 1 mm. La capsula chitinosa può anche calcificarsi; essa presenta ai poli un certo numero di cellule adipose. Per giungere alla diagnosi è necessario trovare il vermiciattolo, perchè la presenza di puntini biancastri può esser dovuta a focolai actinomicotici calcificati, a depositi di tirosina, a sarcosporidi.

Quando i puntini non si vedono ad occhio nudo, specie se le cisti non sono calcificate, se si tratta di carni conservate, se ne dilacerano pezzetti presi a caso, in acido acetico al 0.20 %; se si tratta di carni fresche si dilacerano in semplice cloruro sodico le fibre dei pilastri del diaframma, dello psoas, della lingua, dei muscoli intercostali ed addominali. Quando le cisti siano calcificate, si può favorire l'uscita del vermiciattolo dilacerando il materiale in acido cloridrico o solforico al 2-5 % e osservare il preparato ad ingrandimento di 40 diametri.

d) *Carni con vermi allo stato adulto.*

Se si tratta di fegato di bovini, equini, suini, nei dotti biliari si può trovare il *Distoma hepaticum* dalla caratteristica forma di foglia di mirto; se si tratta di fegato di ovini è facile trovare insieme al *Distoma hepaticum*, un altro distoma più piccolo, il *lanceolatum*, le cui uova sono più piccole, ovoidali, opercolate, nerastre.

Se si tratta di polmoni di ovini (specialmente di montone e di capra) si può ritrovare il nematode noto col nome di *Strongilus filaria* che non va confuso con lo *Strongilo rossastro*, più piccolo.

Se invece si tratta di polmoni di bovini ed equini (cavallo, asino specialmente) si può trovare lo *Strongilo micruro*, il quale non va con-

fuso, quando si trova nei bronchi del cavallo e dell'asino, con lo *Strongilo d'Arnfield*, ch'è più piccolo.

Se si tratta di polmoni di suini, si può trovare lo *Strongilo paradosso*.

Nella cute, nel cuore, nel sangue, nel peritoneo, nel fegato, nei bronchi, nell'occhio, ecc., dei vari animali (buoi, cavalli, asini, muli, cani, polli, piccioni, rane) si possono poi trovare le più diverse *filarie*, la cui presenza si riconosce spesso senza l'aiuto del microscopio: è sempre però anche con questo difficile stabilirne la specie.

e) *Carni con sarcosporidi*. — Si notano nei suini, parallelamente alle fibre muscolari striate, delle strie bianche o bianco-grigie grandi mm. 2-4 × 0.5 che prendono il nome di otricoli o sarcocisti.

L'aspetto di questi otricoli o sarcocisti è quello di sacchetti fusiformi: la cuticula che li delimita, presentasi nei muscoli del porco striata trasversalmente (fig. 189), sembra per la presenza di poricanali, e i corpi

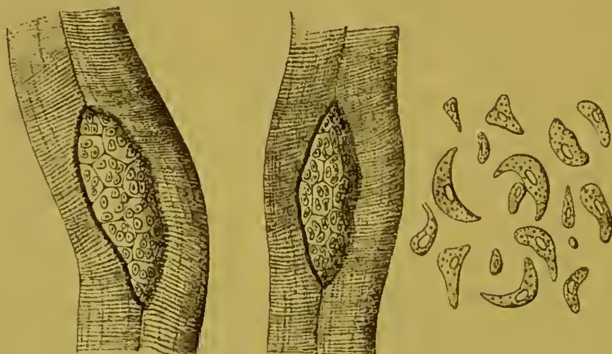


Fig. 189.

che vi si contengono hanno forme diversissime: globulare, ovalare, semilunare, sino alla reniforme che sarebbe quella dei corpuscoli adulti, omologhi ai corpuscoli falciformi delle gregarine.

Questi corpi furono chiamati otricelli e otricoli del Miescher o corpuscoli del Rainey, gregarine miescheriane, *Synchytria miescheriana*, *Miescheria utriculosa*. Sono molto comuni nel maiale ove prediligono gli stessi muscoli dove si trova generalmente la trichina. Si possono rinvenire anche nell'esofago e nella lingua del cavallo. Nei bovini si possono trovare nei muscoli del dorso e delle spalle ed anche nella lingua.

Un altro sarcosporidio, la *Sarcocystis tenella*, è frequentissimo nelle pecore dove predilige l'esofago, ma può trovarsi anche nei muscoli del cuore, onde la morte per cardioparalisi: esso diviene visibile ad occhio nudo in forma di noduli biancastri grandi quanto un grano di miglio e più ancora. In quest'ultimo caso, quando cioè i noduli sono tanto sviluppati, prende il nome di *Balbiania gigantea*.

Anche nelle fibre muscolari dei bovini fu rinvenuto un sarcosporidio non ancora ben definito (*Sarcocystis blanchardi?*).

4. Esame microscopico per riconoscere se ad una data carne siano commiste sostanze estranee o carni di altri animali. — Sono le carni conservate quelle alle quali si possono trovare commiste sostanze estranee, e generalmente sono gli amidi quelli che più di frequente vengono aggiunti.

La ricerca dell'amido si fa strofinando frammenti di carne sopra un vetrino e poi bagnando la parte imbrattata con acqua o con glicerina diluita e coprendola col vetrino coproggetti. Si osserva quindi il materiale al microscopio, aggiungendo lateralmente al vetrino coproggetti una goccia di tintura di iodio diluita: se ci sono corpuscoli di amido si coloreranno in bleu. Bisogna però aver cura di non tener conto dei piccoli granuli in cui non è visibile la striatura, perchè per lo più questi appartengono al pepe. Del resto, in genere, la farina aggiunta è quella di patate, per cui o si troveranno frammenti di granuli o grossi granuli più o meno rigonfi e sfaldati. L'aggiunta di farina si fa per aumentare la così detta proprietà di legare, ossia di assorbire acqua, ciò che rende la carne conservata succolenta, coerente al taglio. Presso di noi costituisce una frode: non però così in altri paesi, dov'è tale usanza: per es. alla salsiccia, si ritiene da molti salumai in Germania, che sia necessaria l'aggiunta del 2 per cento di farina.

Molto più difficile è riconoscere se nelle carni conservate siano commiste altre carni· almeno l'esame microscopico è di poco o niun aiuto in tale ricerca. In genere è la carne di maiale, specialmente se insaccata, che viene mescolata o addirittura sostituita con altre: per es. con quella equina. A fare una diagnosi differenziale possiamo oggidì ricorrere alla prova sierodiagnostica che però è lunga e difficoltosa. Con essa recentemente, per es., il Grönig sarebbe riuscito a dimostrare la presenza della carne equina in carni non solo fresche, ma salate, conservate e affumicate di altri animali.

Si preparano a tal uopo dei conigli inoculandoli nel peritoneo per 4-8 volte ogni 5 giorni con estratto di carne equina o meglio con siero di cavallo (Fiche), in quantità di 15 cmc. per volta, dopo averlo riscaldato a 37°. Dopo 8 giorni dell'ultima iniezione si salassa il coniglio e se il siero di questi animali aggiunto a sangue di cavallo diluito produce subito un precipitato a fiocchi fini o grossi, esso è pronto. Allora si preparano degli infusi delle carni sospette e a questi infusi si aggiunge il siero specifico. Si ha un precipitato solo nell'infuso fatto con carne equina o con altra carne in cui è mescolata l'equina.

Questo procedimento è meno rapido ma sembra più sicuro di quello del Nötel il quale inocula succhi nello speco vertebrale dopo averli trattati con soda all'1 %.

Per eseguire la prova, secondo Stuble e Fally, si prende 1 gr. di carne, si pesta nel mortaio, vi si aggiungono 50 cmc. di acqua distillata contenente 0.50% di fenolo e si lascia macerare per 10 minuti. Quindi si filtra e si ripartisce il filtrato in quantità di 1 cmc. in tubi di 8 mm. di diametro. Si

conserva un tubo controllo e negli altri si versano 10 gr. di siero anticavallo, antibue, antimaiale, ecc.

I sieri si possono conservare anche disseccati imbibendo con essi delle striscie di carta bibula che poi si lasciano essiccare.

I filtrati dei macerati debbono esser limpidissimi. Fiche vuole si filtrino attraverso carta Schleicher o anche, quando non risultino perfettamente limpidi, attraverso candela.

Il tempo che deve trascorrere dopo aver fatta la mescolanza dell'estratto col siero per giudicare della specificità della reazione è relativo al titolo dell'antisiero e al modo di eseguire la prova. Così mentre Stubbe e Fally giudicano della positività della prova dopo 6 ore, Fiche invece dopo 5 minuti coi prodotti crudi e dopo 2 ore coi prodotti cotti.

Il Fiche però usa un siero attivo all'1:10,000 e deduce la positività della prova dall'anello che si forma nel punto di unione dei due liquidi, facendo colare l'antisiero sull'estratto lungo le pareti delle provette. Secondo questo autore, nel caso di estratti crudi, se si fa la osservazione dopo 1 ora, si può trovare positiva la prova anche nelle mescolanze al decimo di estratto di carne di cavallo più siero antibue, antimaiale, antivitello, mentre facendola prima non si nota nulla. Nelle mescolanze di estratto di carne di cavallo più siero anticavallo al ventesimo l'anello, invece, si ha dopo 5 minuti.

Lo stesso Fiche nei casi di carne conservata dà queste indicazioni:

Si taglia il campione di carne da esaminare e si sospende in soluzione di *NaCl* fisiologica col 0.5 % di acido fenico nei rapporti di 1 per 40 generalmente e in quelli di 1 a 10-20 se si tratta di salsiccie. Si pone in ghiacciaia per 12 ore scuotendo e si filtra attraverso un filtro quadruplo (Schleicher e Schull, n. 602) o anche attraverso candele Berkefeld.

In un tubo da saggio del diam. di 4 mm. si versano 3 goccie dell'estratto di carne, più 3 goccie antisiero e si pongono in istufa insieme a tubi controllo contenenti 3 goccie dello stesso estratto, più 3 goccie di altri antisieri (di bue, cavallo, maiale). Dopo 5, 30, 60 minuti si esaminano i tubi e si prendono i risultati. Solo se si tratta di salumi cotti, si prolunga il tempo dell'osservazione, ed in tutti i modi non bisogna credere che i risultati in quest'ultimo caso siano sempre ineccepibili. Il Gayoux ritiene infatti che per il fatto che la cottura coagula le albumine, i prodotti di salumeria cotti, non possano con certezza esser sottomesse all'azione dei sieri precipitanti. Il metodo secondo questo autore non è applicabile attualmente che alle carni salate ed affumicate.

5. Esame microscopico per riconoscere se le carni siano fresche, frolle, putrefatte, degenerate, avariate, ammuffite, o colorate. — *Le carni fresche* presentano le fibre ben dissociabili, conservano la loro elasticità, permettendo una certa trazione senza spezzarsi; il sarcolemma e il contenuto delle fibre sono molto trasparenti, gli strati mono- e birefrangenti sono netti ma poco apparenti; i nuclei sono chiari e contengono nucleoli; attorno al nucleo e sovrattutto ai poli esiste sempre uno strato di protoplasma granuloso; avanzo del protoplasma primitivo. Durante poi il periodo della rigidità cadaverica le fibre sono meno elastiche, più compatte e più friabili; è difficile ottenere fibre

lunghe; le striature sono molto più evidenti che nelle fibre di muscolo fresco. (Fiorentini).

Le carni frolle hanno perduto quasi completamente la loro elasticità; tentando di dissociare le fibre non si riesce che a spezzarle; il protoplasma si spappola e si scinde entro il sarcolemma il quale conserva ancora un certo grado di resistenza e di elasticità tanto da resistere a quelle pressioni che con gli aghi gli si imprimono nelle preparazioni; gli strati mono- e birefrangenti tendono a scomporsi e ridursi in forme fibrillari e granulose; i nuclei del sarcolemma sono pochissimo visibili ed il protoplasma è in gran parte opaco. (Fiorentini).

Le carni putrefatte si riconoscono molto bene per i caratteri fisici. Qualora però fosse necessario procedere a ricerche speciali, per es. per il sospetto che appartengono ad animali morti di malattie infettive, si possono fare preparati a fresco e colorati per vedere se vi siano microrganismi e chiedere aiuto alla batteriologia.

Occorre però essere molti cauti prima di giudicare in via di putrefazione una carne che contenga dei germi, poichè è ben vero che finchè dura la rigidità cadaverica nelle carni di animali sani non si trovano germi; ma non è così nelle carni frolle, che sono poi quelle che si mangiano. Non è quindi consigliabile di ritenere inadatta al consumo quella carne che l'esame batteriologico rivela contenere nel suo interno germi banali, perchè può essere semplicemente frolla. Nelle carni pufrefatte il maggior numero dei germi trovasi alla superficie e facendo delle colture a piatto, con un po' di raschiatura superficiale, primeggiano le colonie del *B. vulgare* (*Proteus vulgaris*). Quando poi si tratti di carni conservate è esclusivamente il criterio fisico quello che guida alla diagnosi.

Va da sè che, in assenza del criterio fisico e del criterio batteriologico, non bisogna confondere con carni alterate da processi putrefattivi quelle le cui fibre si presentano al microscopio in preda a *fatti degenerativi* (fig. 190, *a*-*b*-*c*): si possono trovare fibre a contenuto granuloso come spruzzate con inchiostro di Cina, col contenuto granuloso che scompare dietro aggiunta di acido acetico (*degenerazione albuminoide*); fibre che presentano un contenuto fatto di goccioline adipose finissime (*degenerazione grassa*), che non si disciolgono con l'aggiunta di acido acetico; fibre che presentano la sostanza contrattile disposta in masse zollose ed accartocciate (*degenerazione cerea*), ecc. (v. anche *Ispezione delle carni*, Vol. I).

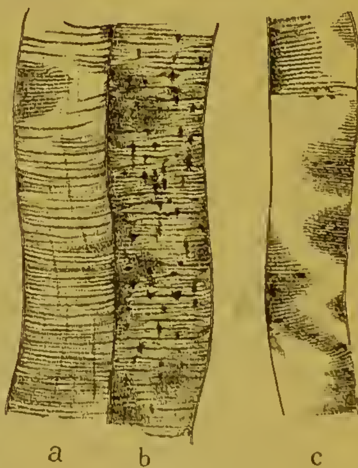


Fig. 190.

Le *carni contenenti acari* sono specialmente quelle che trovansi in commercio, seccate o polverizzate. È facile riconoscere la presenza di questi esseri, se viventi, esaminando direttamente, in soluzione fisiologica

di cloruro sodico, un frammentino in cui si scorga qualche punto polverizzato: se le carni sono vecchie e gli acari sono morti, si troveranno i loro cadaveri o frammenti di essi (fig. 191, *a*), od anche le uova (fig. 191 *c*).

Le carni essiccate, specialmente se di pesci, possono andare soggette alla così detta *tarlatura* che è data da particolari insetti. Così lo stoccofisso tarlato è pieno di larve del *Dermestes lardarius*, la stessa larva che infesta il lardo, le pelli grezze e il baco da seta. (Sedero).

Le carni ammuffite finalmente, oltre che per i caratteri fisici, si dovrebbero riconoscere al microscopio per la presenza di micelî appartenenti a diverse muffe, diagnosticabili per mezzo delle loro terminazioni fruttifere; ma perchè si abbia questo reperto allo esame microscopico, è

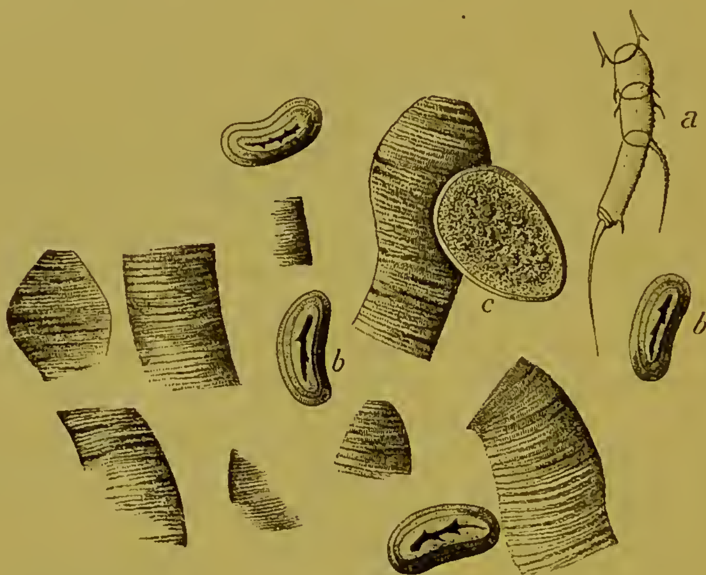


Fig. 191.

necessario che l'ammuffimento sia recente. Se è vecchio, non si troveranno che spore, cioè corpuscoli rifrangenti o rotondi od ovali, grandi 5-7 μ, a contenuto omogeneo senza vacuoli (se questi vi sono è più probabile si tratti di blastomiceti).

Pare che certi pesci secchi come i baccalà i quali si trovano in preda al così detto impolveramento (baccalà impolverati) non siano che baccalà ammuffiti poichè sono stati trovati in essi una quantità di muffe (penicilli, botriti) coi loro ifi, proprio nello spessore della carne. Oltre alle muffe questi baccalà sono anche ricchi di batteri e di cocchi, specialmente cromogeni gialli, di blastomiceti, come la *Torula epizoa* in Norvegia, il *Saccharomyces irlandicus* in Irlanda.

Qualcuno può dare al baccalà, se tenuto in luogo umido, anche una colorazione speciale cerulea o verdognola. È il bacillo verde del baccalà.

Le carni colorate, conservate ed insaccate, possono esserlo per opera di germi. A volte infatti si forma alla superficie della carne una colo-

razione rossa, dovuta ad un germe di facile diagnosi, il *B. prodigiosum*, che non è però quello che colora le carni conservate, specialmente di pesce. A questo proposito è bene ricordare che mentre per il primo non si impedisce il consumo della carne, per il secondo, almeno nel caso in cui i pezzi di pesce siano colorati in rosso, occorre distinguere caso da caso.

A proposito della colorazione rossa dei pesci va notata quella cui va soggetto il baccalà. Causa di essa furono ritenuti diversi germi; delle muffe, la *Chathrocystis roseo-persiana*, il *Penicillum roseum*; dei bacilli tra cui il così detto bacillo rosso di Terra Nuova; dei cocchi, tra cui il così detto Micrococco rosso del baccalà. Recentemente è anche stato isolato un batterio corto, tozzo, che si pigmenta in rosso lentamente nei terreni culturali, col quale si riesce a riprodurre la colorazione rossa del baccalà. (Trincas).

Noto che il baccalà può anche esser colorato in giallo da un micrococco giallo e in ruggine da un altro micrococco.

Se la colorazione è solo superficiale (rosso di 1° grado) il baccalà è commestibile: se invece al di sotto della colorazione la carne non è sana e soda (rosso di 2° grado) non lo è. Si distinguono perciò due sorta di baccalà colorato, quello rosso sano e quello rosso alterato.

Si possono anche trovare le carni fosforescenti; ma sono reperti estremamente rari. Se non si associano processi putrefattivi, queste carni guaste, ma non nocive, sono del resto ancora commestibili.

Grasso.

In quanto al grasso o strutto, a parte la frode che si commette vendendo una data specie di esso, per esempio quello di maiale con l'aggiunta di grasso di bue, la cui scoperta si può avvalorare anche mediante l'esame microscopico di cristalli che si formano dopo speciali trattamenti del grasso (V. *Chimica applicata all'igiene*), l'igienista può essere chiamato a dire se ad esso vi siano commisti corpi estranei, come amido, polveri minerali, ecc., e se si tratta di grassi animali o vegetali.

È molto facile ritrovare queste sostanze, prendendo una determinata quantità di grasso e facendolo bollire con il doppio di acqua, lasciando quindi in riposo il materiale dopo averlo versato in un bicchiere a calice. Se vi sono corpi estranei a poco a poco precipitano mentre il grasso rimane galleggiante, Allora non rimane che raccoglierli, dopo decantazione, con un pipetta ed esaminarli al microscopio. La raccolta si fa molto bene, se si versa il liquido caldo in un imbuto al cui collo sia applicato un tubo di gomma stretto da una pinza. Quando si creda giunto il momento della completa separazione dei corpi estranei dal grasso, si apre la pinza, facendo pervenire il deposito e una certa quantità di acqua in un sottostante bicchiere a calice, badando di richiudere a tempo, cioè prima che passi il grasso. L'acqua pervenuta nel bicchiere a calice si lascia a sè sino a che si è formato il deposito, oppure si centrifuga e si esamina il residuo.

Per la diagnosi differenziale dei vari grassi si può anche aggiungere che si è tentato di applicare la siero-reazione precipitante.

Finora le prove sono state fatte con gli olî. I sieri di cani, conigli trattati con olio di oliva, cotone, arachide, acquistano proprietà precipitanti specifiche sugli estratti acquosi dei rispettivi olî (Loudin) e l'A. crede che questo metodo possa trovare un'applicazione nella diagnosi differenziale dei grassi e olii.

L'esame microscopico può però fino ad un certo punto permettere di distinguere i grassi animali dai vegetali, dai cristalli di fitostearina e colesterina. Quelli di fitostearina sono rappresentati da sottili tavolette relativamente larghe con contorno romboidale. Nei miscugli di fitostearina e colesterina si trovano aghi cristallini che sono prismi triangolari.

Questo in linea generale. Nei singoli casi poi a seconda del tempo impiegato nella cristallizzazione, della quantità maggiore o minore della fitostearina o della colesterina ecc., si possono avere cristalli con altri particolari. Nel manuale del De Giaxa a pag. 377 ci sono dettagli che possono al riguardo esser consultati.

ESAME MICROSCOPICO DEL LATTE, DEL FORMAGGIO E DEL BURRO.

Latte.

L'esame microscopico del latte deve essere diretto a vedere se si tratti:

di vero latte o di colostro;
di latte proveniente da mammelle sane o malate;
di latte contenente germi che ne alterino la costituzione;
di latte contenente germi di malattie infettive;
di latte annacquato o scremato, con l'aggiunta di sostanze diverse;
di latte contenente del sudiciume;
di latte di vacca, di pecora, di asina, ecc.

1. Esame microscopico per vedere se si tratti di vero latte o di colostro. — Questa ricerca riesce molto facile, perchè diversi sono gli elementi morfologici del latte a seconda che si tratta di latte proveniente da ghiandole mammarie funzionanti da poco tempo o no, cioè a seconda che si tratta del colostro o del latte propriamente detto: nel primo evvi un numero di elementi maggiore di quello che si trova nel secondo.

Per praticare tale ricerca si versa del latte in un bicchiere a calice, si lascia sedimentare, si raccoglie con una pipetta un po' di sedimento, lo si depone sopra un portoggetti e si copre con il coproggetti.

Lasciato a sè il preparato per un certo tempo, in modo che i globuli di latte vengano a galla, e gli altri elementi si depositino, lo si esamina all'ingrandimento di 300-400 D, avendo cura di non comprimere il vetrino coproggetti.

Gli elementi morfologici del colostro sono (fig. 192):

a) *i globuli lattei* sferici a contenuto splendente e incoloro, a contenente così accentuato da sembrare costituito da un cerchietto oscuro, grandi da 2 a 10-12 μ, generalmente riuniti in ammassi di globuli di diversa grandezza;

b) *i globuli mucosi* di Donnè che sono di origine leucocitaria e che sono rappresentati da cellule grandi, irregolarmente rotondeggianti od ovali, nucleate (ma a nucleo non sempre visibile), contenenti goccioline adipose, molto piccole, giallognole, le quali cellule non vanno confuse con quelle che compaiono alla fine della lattazione e che si presentano di aspetto granuloso, come quelle che si osservano in casi di mammite e durante gli stati febbrili;

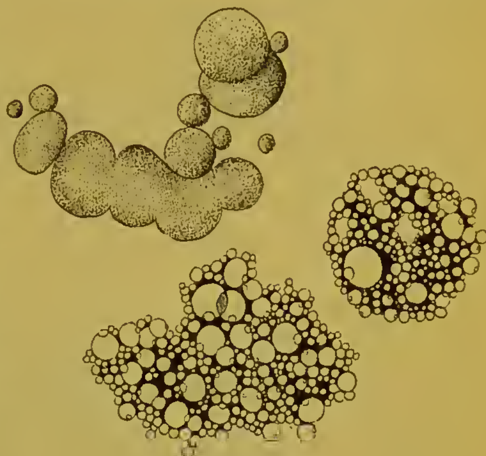


Fig. 192.

c) *i corpuscoli del colostro propriamente detti*, ossia cellule come le precedenti ma più grandi (30-40 μ), a nuclei invisibili, zeppe di globuli lattei (incolori).

Questi cospuscoli scompaiono di solito dal 3° all'11° giorno: però il ritrovarne qualcuno anche dopo non ha alcun significato, giacchè è stato assodato che in gran numero di latti di vacche si possono trovare anche dei corpuscoli durante tutta la lattazione.

Fissati e colorati, il Lourié li descrive come cellule moriformi a protoplasma granuloso, crivellato di vacuoli ripieni di grasso.

Il nucleo unico, doppio o eccezionalmente triplo, si colora con le sostanze coloranti basiche, occupa il centro o la periferia della cellula, è sferico o depresso in un punto della sua circonferenza da goccioline di grasso in modo da assumere forme diverse sin quasi a foggiarsi a semiluna.

d) rare cellule pavimentose a contorni delicati, a nucleo ovale circondato da protoplasma finamente granuloso, spesso contenente goccioline di grasso;

e) rari leucociti per lo più fortemente granulosi.

Gli elementi morfologici del vero latte (fig. 193) si ritiene in genere siano i soli *globuli lattei*, già descritti, che distinguonsi da quelli del colostro specialmente perchè non sono più disposti ad ammassi, ma isolati; sono anche di grandezza in massima meno varia.

Se il latte è stato bollito si trovino anche dei corpi sferici costituiti da un gran numero di cristalli aghiformi di acidi grassi disposti per lo più in forma raggiata (fig. 194).

Però in realtà non è così. A bene studiarli si è visto che i globuli sono distinguibili in diversi tipi fra loro differenziabili. Il Nalli ne ha distinto i cinque seguenti:

1° lipoglobuli, (globuli aplasmici) o globuli grassi propriamente detti, sprovvisti di protoplasma;

2° lipocelloidi, globuli grossi provvisti di protoplasma;

3° celloidi, dati da masse protoplasmatiche indipendenti, provviste o no di piccole gocciole pallide e rifrangenti di grasso;

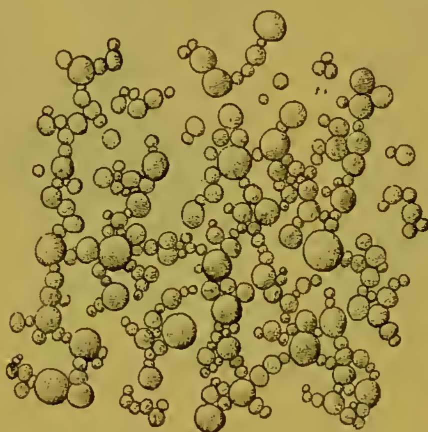


Fig. 193.



Fig. 194.

4° plasmoidi o aggregati di globuli grassi di grandezza variabile riuniti da una ganga protoplasmatica;

5° zonoidi, lamelle sottili a contorno semiregolare, di forma più o meno quadrata, rettangolare o trapezoidale, racchiudenti goccioline di grasso in numero più o meno grande.

Solo i lipoglobuli e i lipocelloidi di media grandezza ed eccezionalmente anche grande, sarebbero da ritenersi veramente appartenenti a latti sani; gli altri indicherebbero uno stato patologico più o meno manifesto.

Inoltre nel latte si troverebbero anche degli elementi cellulari ben definiti che non sarebbero, come vogliono alcuni, dei leucociti, ma giovani cellule epiteliali e cellule del così detto strato germinativo staccatesi ed entrate nella corrente del latte. Queste cellule potrebbero anche esser molto numerose, e il loro aumento di numero potrebbe stare in rapporto con cambiamento di cibo o con leggeri disturbi della secrezione lattea.

Le cellule polinucleate che si trovano nel latte non sarebbero dei leucociti ma giovani cellule epiteliali, distaccatesi (Villar e Revis). Difatti, non si colorano, come i leucociti, non presentano movimenti ameboidi, non inglobano batteri, si trovano in latti perfettamente sani (Hewlett, Villar e Revis).

È interessante notare, come risulta da ricerche dell'Alessi e del Carapelle, che nel latte di capre e vacche gestanti, i globuli si presentano deficienti

o privi completamente di grasso: laddove è deficiente la sostanza grassa, occupa un segmento della cellula e si raggruppa in forma di granuli o di noduli, dei quali le cellule galattofore appaiono più o meno disseminate. Laddove la sostanza grassa è assente, le cellule galattofore si avvizziscono mostrandosi come piccole zolle di protoplasma raggrinzate e senza forma (1).

2. Esame microscopico per riconoscere se si tratti di latte proveniente da mammelle sane o malate. — Spesso accade che il latte venga secreto da mammelle malate durante alcuni periodi di ingorgo o di infiammazione delle mammelle stesse.

L'esame microscopico in questi casi mette in evidenza: un buon numero di *leucociti*, dei quali alcuni si presentano inalterati e gli altri sono talmente rimpinzati di globuli lattei da ricordare i corpuscoli del colostro; ammassi di globuli lattei trattenuti da mucina i quali prendono il nome di corpuscoli moriformi.

Sulla quistione della presenza dei leucociti nel latte evvi però molta discussione, alcuni propendendo a credere che con essi si siano confuse delle cellule che non hanno importanza di sorta, come ho già detto a proposito del latte normale, altri, ritenendo che un buon numero di leucociti possa trovarsi in un latte senza che questo possa ritenersi sospetto, e altri ritenendo che i leucociti stiano sempre ad indicare fatti infiammatori: pure tenendo anche in debito conto la quantità in cui si trovano, ad esempio ritenendo che un latte, non sedimentato, contenente, per ogni campo microscopico osservato a 300 diametri, più di 5 leucociti, debba ritenersi nocivo.

Hoffmann e Russel elevano invece il numero tollerabile di leucociti a 500,000 per cmc. e ritengono che essi stiano a indicare che il latte è nocivo solo quando questo numero si eleva ed insieme si può dimostrare la presenza di fibrina nel latte.

Per determinare il numero dei leucociti nel latte, secondo questi autori, si riscaldano 10 cmc. di latte a 70°, si centrifuga con centrifuga a 1200 giri, per 20 minuti. Si toglie il liquido fino a lasciare mezzo cmc. di latte al fondo. Si agita il sedimento e si aspira con pipetta parte di esso col quale, fatto un preparato, si procede alla conta dei globuli bianchi a mezzo del microscopio, riportandone il numero trovato a 1 cmc. di latte.

In questo modo essi hanno trovato che a 500,000 si può portare il numero dei leucociti in un latte sano.

Essi hanno anche veduto che il tasso leucocitico è più elevato nelle vacche adulte che nelle giovani.

Quanto alla ricerca della fibrina, essa si fa colorando il latte con il metodo di Weigert.

Sempre a proposito del significato dei leucociti nel latte, va anche notato che escludendo dal novero loro, tutte le cellule che possono anche trovarsi in un latte sano e che erroneamente si ritengono da molti, leucociti

(1) Nel lavoro di questi studiosi si trovano anche interessanti osservazioni sulla morfologia del latte di donna gestante, a seguito del parto, e ammalate.

polinucleari, secondo Villar e Revig, i leucociti in gran numero in un latte sano, non vi si troverebbero mai. Ve ne sarebbero molti in un latte solo quando la mastite è così avanzata da esser evidente allo stesso aspetto macroscopico del latte.

Insieme ai leucociti si possono notare anche dei corpuscoli rossi, e in certi casi anche non commisti a leucociti. Ciò accade in seguito a congestione dei vasi delle glandole mammarie, aventi esito in piccole emorragie ghiandolari, nel periodo che precede quello dell'allattamento od in seguito a lesioni dei capezzoli.

Si riescono facilmente a rinvenire questi elementi, lasciando a sè il preparato senza comprimerlo. Si mettono allora dapprima a fuoco i corpuscoli di latte che trovansi aderenti alla superficie inferiore del coproggetti e poi si abbassa il tubo portalenti, per osservare gli altri strati del materiale, sino a trovare gli elementi cellulari più pesanti sulla superficie del portoggetti.

Si può anche diluire il latte con acqua, e poi esaminarne il sedimento, oppure centrifugarlo ed esaminare il residuo della centrifugazione (Fiore) oppure adottare il metodo di Tromsdorff di esaminare il sedimento del latte centrifugato, previo sgrassamento.

3. Esame microscopico per riconoscere se il latte contenga germi che ne alterino la costituzione. — Conviene qui tenere presente che sebbene sia stato accertato che il latte di per sè, appena munto, ha un certo potere antibatterico, nel senso che per qualche ora impedisce lo sviluppo dei germi che vi si aggiungono (da 3 a 9 ore secondo alcuni) potere che diminuisce nel latte riscaldato a 60° sino a perdersi in quello portato a 100°, tuttavia, non v'ha dubbio che esso diviene dopo poco tempo, sia crudo e ancor meglio se cotto, un ottimo terreno di coltura per molti germi. Miquel, per es., trovò che un latte che all'arrivo in laboratorio conteneva 9000 batteri, dopo 2 ore ne conteneva 36,250 dopo 9 ne conteneva 360,000, dopo 25 ne conteneva 5,600,000 per cmc.

Inoltre bisogna tener presente che oltre ai germi che vi penetrano nell'atto della mungitura, e poi quelli che vi si aggiungono nei recipienti di raccolta, il latte non è mai sterile perchè nei condotti galattofori esistono sempre dei batteri i quali trovano in essi alimento dallo stesso latte che vi residua dopo ogni mungitura (un latte raccolto con la massima asepsia secondo Boekhout e Vries, contiene una media di 230 batteri per cmc.). Il latte quindi non può essere mai sterile, anche di germi banali. È per questo che alcuni hanno voluto limitare, come si fece per l'acqua, il numero dei germi che normalmente si può trovare in un latte crudo adatto alla alimentazione, portandolo al limite massimo di 50,000 per cmc., e che la maggior parte degli studiosi, tenendo presente che non il numero, ma la qualità dei germi ha importanza dal punto di vista sanitario, ritiene necessario che il latte, qualunque sia la sua provenienza debba esser sempre sterilizzato per lo meno tenendolo a 60° per 20 minuti, essendo noto che a questa temperatura molti germi muoiono nel latte (il *Vibrione del colera* tra 55°-60°; il *bacillo dissenterico* e il *B. del tifo* in 10 m. a 60°, il *B. della febbre di Malta* tra 58°-60°) e che altri perdono la loro virulenza e divengono incoltivabili (il

B. della tubercolosi a 60° in 20 m. diviene avirulento per le cavie, il *B. della difterite* tra 55°-60° diviene incoltivabile).

Ora è alla presenza di germi nel latte che sono da attribuirsi quasi tutte le alterazioni così dette spontanee del latte e dico quasi tutte poichè un certo numero di esse può anche devolersi a materiali non organizzati provenienti dall'alimentazione.

Sono conosciute alcune alterazioni così dette spontanee del latte: coll'esame microscopico si può dimostrare se esse siano prodotte da microrganismi o no.

I quesiti quindi che possono risolversi sono i seguenti:

a) *Se il latte sia coagulato per opera di microrganismi che vi si siano sviluppati.*

La coagulazione del latte per opera di microrganismi può essere dovuta alla produzione di acido lattico oppure a un enzima.

La coagulazione dovuta alla produzione di acido lattico devesi a microrganismi i quali si possono distinguere in due gruppi: il primo costituito dai microrganismi specifici della fermentazione lattica ed il secondo da microrganismi i quali eventualmente trovandosi nel latte possono determinarla, o microrganismi facoltativi della fermentazione lattica, ecc.

Oggidì se ne conoscono di quelli specifici della fermentazione lattica e sono stati anche distinti a seconda che producono o no gas; ma in fondo il più comune è un bacillo, e precisamente il *B. acidi lactici* di Hüppe.

In quanto a quelli così detti facoltativi della fermentazione lattica, sono diversi: tra gli schizomiceti, gli stafilococchi piogeni, il bacillo piogene fetido, il batterio del colon, ecc.; tra i blastomiceti il *Saccharomyces lactis* del Duclaux, il *Saccharomyces acidi lactici* del Grotenfelt, ecc.

La coagulazione dovuta alla azione di un enzima chiamato dal Duclaux presame, è prodotta per lo più dai così detti *Tyrothrix*: però essi non sono i soli: anche altri, comunissimi, sembrano dotati della stessa proprietà.

È interessante notare che esistono in commercio anche dei latti così detti fermentati, latte acido, latte agro al quale nei diversi paesi si dànno i nomi più disparati. In questi latti sono stati trovati diversi germi, ai quali è stata attribuita la causa della coagulazione del latte stesso, ma il più comune è il *B. bulgaris* o *bulgaricus* o *maya*, al quale alcuni riportano anche altri germi del latte fermentato come lo *streptobacillus lebenis* (del latte fermentato dell'India) il *B. panis fermentati*, il *B. bifidus* e persino una forma simile alla *Streptothrix buccalis*. Il *B. bulgaricus* è un germe che produce il 3 % di acido dal lattosio (formato dal 6 % di acidi volatili e il 94 % di acido lattico).

Quando esso si sviluppa nel latte, avrebbe la proprietà di distrurre tutti i germi patogeni non sporigeni e tutti i proteolizzanti.

Insieme a questo germe sono però anche stati descritti in questi latti fermentati e con costanza, un *diplococco*, delle *streptothrix*, ecc. Si parla anche di un *B. caucasicus* che ha le stesse proprietà del *B. bulgaricus*.

Merita ancora di esser ricordato che alcuni latti vanno soggetti alla così detta *coagulazione prematura*: sono latti che appena riscaldati coagulano con debole reazione acida come se fossero addizionati di presame, o a grumi fini, o a semplice condensazione del liquido, tanto da passare inosservati.

Questa alterazione del latte è stata bene studiata dal Gorini, il quale l'ha legata alla presenza nel latte dei *B. acidopresamigeni*; ossia a quei germi che sono capaci di coagulare il latte con reazione acida debole perchè producono oltre all'acidità un altro elemento che a mo' di presame contribuisce alla coagulazione del latte. Questi germi si troverebbero negli stessi condotti galattofori delle vaccine, per cui il latte appena munto può già contenere dei batteri acidopresamigeni senza bisogno che questi vi arrivino dall'esterno, tanto più che, come fa rilevare il Gorini, la mungitura non è mai perfetta e quindi nei dotti lattiferi restano sempre delle porzioncine di latte che servono di *pabulum* alla flora microbica ivi esistente. Ora il Gorini, in latti in preda alla coagulazione spontanea, ha trovato dei batteri del tipo del *B. coli*, del *B. lactis aërogenes*, accompagnati da cocchi acidopresamigeni e segnala anche l'esistenza di un piccolissimo batterio presamigeno che egli denomina *B. minimus mammae*.

Allorchè l'esame microscopico non rivela nel latte coagulato la presenza di alcun microrganismo, e si può escludere che la coagulazione sia dovuta a batteri, occorre pensare ad altre cause, per es. a sostanze ingeste, ricordando che vi sono dei vegetali i quali ingeriti dagli animali possono determinare la coagulazione del latte, come la *Cynara cardunculus*, il *Ficus carica*, l'*Oxalis acetosella*, ecc.

b) *Se il latte sia colorato per opera di microrganismi che vi si siano sviluppati.*

Quando il latte presentasi colorato e si vuol vedere se ciò è opera di microrganismi, se ne versano alcune goccie in provette contenente latte scremato e sterilizzato mezz'ora per tre giorni nella pentola di Koch.

In tal caso se il latte innestato (naturalmente posto nel termostato) assume la colorazione del latte colorato, devesi ritenere che la colorazione è dovuta a microrganismi; nel caso inverso va attribuita a materiale ingerito dagli animali. Infatti il latte può essere colorato in azzurro per ingestione di *Anchusa officinalis*, di *Mercurialis perennis*, di *Isatis tinctoria*, di *Equisetum arvense*, ecc.; in giallo dal *Melampyrum arvense*, dal *Daucus carota*, ecc.; in rosso dal *Cactus opuntia*, dal *Galium rubioides*, ecc.

La colorazione che può subire il latte per opera di microrganismi può essere la colorazione bleu, la rossa, la gialla, la violetta, ecc.

La colorazione bleu devesi al *B. cyanogenus* s. *syncianeus* o del latte bleu (Hüppe). La tinta varia dal grigio al bleu e non è sempre identica a quella che si manifesta nei vari terreni colturali che si usano in batteriologia, ove il batterio produce un pigmento che va dal bruno al verde.

La colorazione rossa è dovuta a diversi microrganismi, di cui i più frequenti sono il *B. prodigiosum*, la *Sarcina rosea*, il *B. lactis erythro-*

genes, ecc. È stato pure trovato un *Saccharomyces ruber*, oltre al *rosa* comune dell'aria. Il latte in cui si è sviluppato il *Saccharomyces ruber* ha spesso, ma non sempre, una colorazione rosso fragola ed ingerito dai bambini produce diarrea. (Casagrandi).

Le colorazioni gialla e violetta sono meno frequenti: la prima è per lo più dovuta alla *Sarcina subflava* (gialla); la seconda per lo più al *B. janthinum*.

c) *Se il latte abbia assunta una consistenza viscosa per opera di microrganismi*

Allorchè il latte presentasi viscoso o filante, vuol dire che è andato soggetto alla fermentazione viscosa, la quale è prodotta da una serie di microrganismi che sono stati distinti in due gruppi: l'uno rappresentato da quelli che producono una sostanza mucosa o filamentosa dallo zucchero di latte (*Micr. lactis pituitosus* di Hüppe, *Dipl. lactis līodermos* di Schmitz-Rotz, *Strept. hollandicus* di Hüppe); l'altro da quelli che la producono dai corpi albuminoidi (*Bac. lactis pituitosus* di Löffler, *Bac. lactis viscosus* di Adametz, *Bac. mesentericus vulgatus*).

Questi due gruppi di microrganismi possono facilmente differenziarsi col solo esame microscopico facendo parte del primo solo *cocchi* e del secondo solo *bacilli*. Per ricerche più esatte occorre però procedere all'esame batteriologico.

d) *Se il latte abbia perduto la sua normale costituzione per opera di microrganismi diversi*.

Molte volte il latte presenta alterazioni che non possono riportarsi ad alcuna delle fin qui esposte.

L'esame microscopico può in alcuni casi rivelare la presenza di ifi i quali fanno subito pensare ad alterazioni dovute ad *ifomiceti* o a *oidii*. Va ricordato a questo proposito l'*Oidium lactis*, il quale si sviluppa generalmente nel latte in cui si è prodotto acido lattico, purchè la quantità dell'acido formatosi non superi l'1.5 o il 2 %. Fra le muffe è comune il *Penicillium glaucum*.

In altri casi però l'esame microscopico continua a rivelare la presenza di bacilli. Così per es. quando il latte ha sapore amaro, se questo non è dovuto a vegetali ingesti (foglie di *patate*, di *Arthemisia absinthium*, di *Sambucus nigra*, ecc.), può essere dovuto allo sviluppo nel medesimo dei bacilli mesenterici. Così quando il latte ha odore di acido butirrico mentre si può ritenere che abbia subìto la fermentazione butirrica, che può o no essere secondaria alla fermentazione lattica, si possono trovare altri microrganismi per la cui diagnosi, naturalmente, bisogna praticare ricerche batteriologiche. Essi sono: il *Bacillus* o *Vibrio butyricus* del Pasteur, il *Colstridium butyricum* del Prazmowsky, il *Bac. butyricus* (aerobico) dell'Hüppe, cui vanno aggiunti il *Bac. mesentericus vulgatus*, il *Bac. līodermos*, il *Bacillus lactis albus* del Löffler, il *Saccharomyces butyricus* del Valenti, ecc.

In alcuni casi il latte ha un vero sapore rancido. Tale carattere organolettico sarebbe dovuto allo sviluppo nel latte del *B. lipoliticum* del quale ha data la descrizione l'Huss. Sarebbe un germe capace di produrre enzimi, della lipase, e di decomporre i grassi. Resisterebbe anche molto insieme agli altri batteri lattici.

Bisogna anche aggiungere che le alterazioni possono esser dovute ad anaerobi, che sono stati trovati costantemente dal Rodella, tanto nel latte fresco che in quello in via di putrefazione.

4. Esame microscopico del latte per riconoscere se contenga germi causa di malattie infettive. — Dal punto di vista igienico è certamente questa la ricerca più importante a farsi: è però impossibile riuscirvi senza l'aiuto della batteriologia.

Anzitutto conviene tenere presente che si parla di una malattia da latte (*milk sickness* degli Inglesi) prodotta dall'ingestione di latte di vacca (che si è supposto essersi alimentata con pasture avvelenate), la quale malattia sarebbe, secondo Jordan e Harris, invece dovuta a un germe simile al tetanico che sarebbe patogeno oltre che per l'uomo, per i vitelli, i montoni, i cani, il ratto, il gatto, il cavallo, il coniglio. Chiamasi *B. lactimorbi*, germe che si sarebbe trovato diffuso nel suolo, nelle feci degli animali e sulla superficie delle foglie di certe piante che mangiano le bestie.

Nei casi di *milk sickness* si sarebbe trovato solo o associato allo *stafilococco* e al *B. coli*.

Inoltre è oggimai dimostrato che nel latte possono trovarsi dei germi capaci di produrre quei fenomeni che si hanno anche nei così detti casi di intossicazione alimentare per mezzo della carne.

Sono stati trovati il *B. di Gärtner*, il *B. paratifo* B, ed il *B. faecalis alcaligenes*, la cui ricerca necessita, come sempre, di serie e dettagliate indagini che esorbitano dal solo campo microscopico.

I microrganismi patogeni che esistono nel latte sono però generalmente scarsi, sicchè la ricerca, col semplice esame microscopico, spesso riesce infruttuosa, pure essendo il latte in esame dai medesimi inquinato: ciò vale anche per quelli diagnosticabili per mezzo di colorazioni specifiche. Il più delle volte è necessario ricorrere ad altre prove, colture, sierodiagnosi, inoculazioni negli animali.

I germi che più di frequente accade di dovere ricercare nel latte sono il *B. tubercolare*, il *B. melitense*, poichè di tubercolosi e di febbre di Malta possono trovarsi infetti gli animali lattiferi.

Sulla presenza del *B. della tubercolosi* nel latte, si è molto discusso, ritenendo alcuni che vi si trovi solo quando contemporaneamente esiste una mastite specifica ed altri anche quando questa manchi. Secondo le recenti ricerche del De Jong si ha anche quest'ultima evenienza, poichè egli l'ha trovato vivente e virulento in 3 su 10 in vacche clinicamente indenni dalla tubercolosi, ma che reagirono alla prova della tubercolina.

Secondo altri, il non trovarlo nel latte, non può neppure farne escludere la presenza in quei casi in cui si trova diminuzione di acidità nel latte stesso (0.74, 0.93, 0.53 gr. di acido lattico $^{0}/_{00}$) poichè presenza del bacillo della tubercolosi e diminuzione di acidità nel latte sarebbero fenomeni correlativi.

Sulla presenza del *B. melitense* nel latte, oggi poi non evvi più alcun dubbio, specie se si tratta di latte di capra; esso però è stato trovato anche nel latte di vacca e persino in quello di pecora, sebbene meno frequentemente.

Oltre a questi germi, come ho già detto, se ne possono trovare nel latte anche altri provenienti dall'animale lattifero quali il *B. enteritidis*, *B. del gruppo del coli*: però la loro presenza si accompagna generalmente a mastite acuta e non dura per molto tempo; da 12 a 30 giorni la eliminazione dei germi del gruppo *coli*, 30 giorni quelli del *B. enteritidis*.

Alcuni hanno anche segnalato la presenza di streptococchi in casi di mammite, streptococchi che possono infettare anche l'uomo.

La quistione dell'importanza degli streptococchi nel latte è oggetto ancora di discussione perchè si è veduto che molti latti sani ne contengono (secondo alcuni, il 50 % dei latti normali è ricco di streptococchi) e che si tratta generalmente di streptococchi banali, dello *streptococcus lactigenus*.

Certo però non è men vero che in casi di mastite, la cosidetta *Gelber Galt* dei Tedeschi, possono trovarsi streptococchi patogeni generalmente capsulati con elementi a disposizione trasversale. La presenza di questi germi accoppiata a quella di molti leucociti, può realmente, secondo i più, far ritenere che il latte appartenga ad animali ammalati e possa esser fonte di contagio.

Volendo procedere alla ricerca dei vari germi patogeni che possono trovarsi nel latte con il solo aiuto del microscopio, è utile, dopo essiccato e fissato il preparato, lavarlo in etere o cloroformio per liberarlo dai globuli di grasso, oppure lasciare essiccare a temperatura ambiente, sopra un portoggetti, una goccia di latte diluita in due goccie di soluzione di carbonato sodico all'1 %, e poi dopo colorare.

Il preparato si può fare direttamente dal sedimento formatosi in un bicchiere a calice o dal residuo centrifugato. È meglio, però, lasciare depositare il latte o se lo si è centrifugato, decantarlo e diluire con acqua il deposito, ripetendo varie volte la prova, avendo cura di esaminare l'ultimo deposito che si viene a formare. (Fiore).

Serve bene poi il metodo dell'Ilkewitsch. Si trattano 20 cmc. di latte con acido citrico; si filtra il materiale e si raccoglie il coagulo; si scioglie il coagulo in soluzione di fosfato sodico e si aggiungono 6 cmc di etere; si centrifuga il materiale ed il residuo si esamina

Si può anche eseguire quest'altro procedimento: si prendono 30 cmc. di latte, si centrifuga, si decanta, e il residuo si tratta con 2 cmc. di potassa al 5 %; si agita e si lascia riposare, per 5 6 minuti; quindi si aggiungono 15 cmc. di acqua distillata, si centrifuga ed il deposito si esamina.

Per la diagnosi poi occorre servirsi di altri mezzi i quali escono dal campo della microscopia.

Per il bacillo della tubercolosi, inoculazioni del residuo ottenuto con la centrifugazione nella faccia interna della coscia di una cavia e inoculazione

in altra cavia delle ghiandole inguinali della prima, per vedere se si tratta del bacillo di Koch o dei pseudotubercolari comuni del latte e del burro, giacchè questi inoculati sottocute di solito producono solo un ascesso locale senza neppure adenopatia nelle vicinanze, e quindi il materiale ghiandolare non trasmette l'infezione da animale ad animale.

Se l'adenopatia si ottiene allora è bene procedere ad inoculazioni endo-peritoneali nelle cavie.

I pseudo-tubercolari o non dànno nulla od una peritonite essudativa. Se si ha generalizzazione dell'infezione, questa si presenta come una setticemia. Il materiale raccolto dal peritoneo solo a grandi dosi, inoltre, riproduce la lesione in altri animali, eccezione fatta per alcuni stipiti (*Mist-bacillus di Möller, Markl, Tobler III e V*).

Quando poi, ciò non ostante, permangano dei dubbi, si può procedere a prove culturali che riescono abbastanza bene a differenziare i germi acido-resistenti dal B. della tubercolosi, essendo essi più facilmente coltivabili e presentando anche delle pigmentazioni rosse, gialle, ecc., che riescono a farli riconoscere. Come pure si può seguire il metodo di Nattan, Larrier e Boveri consistente nell'inoculare i bacilli isolati nelle ghiandole mammarie di cavie lattanti. Secondo questi autori, le mammiti prodotte da bacilli acido-resistenti, non hanno nessuno dei caratteri delle mammiti prodotte dal B. della tubercolosi e non sono accompagnate da adenopatie.

Per il bacillo del carbonchio, inoculazione sottocutanea a cavie nella regione addominale del residuo ottenuto con la centrifugazione, e avvenuta la morte dell'animale, dopo tre giorni tutt'al più, procedere alla diagnosi del carbonchio dall'esame dell'edema gelatinoso sottocutaneo, del sangue del cuore, della milza, ecc.

Per il bacillo del tifo, per i paratifi, per il B. coli e *per il vibrione del colera*, procedere con gli stessi metodi che si seguono per la ricerca di questi microrganismi nell'acqua.

Per il bacillo dissenterico, fare innesti in terreni speciali e altre prove specifiche (v. *Batteriologia*).

Per il bacillo difterico, esaminare il residuo della centrifugazione colorandolo con il metodo di Neisser, fare colture, ecc.

Per il B. della febbre di Malta, servirsi della prova di Zammit col latte intero, oppure anche col siero di latte secondo la tecnica recentemente indicata dal Pulvirenti (v. *Batteriologia*).

5. Esame microscopico del latte per riconoscere se sia stato annacquato o scremato e mescolato a scopo di frode con sostanze diverse. — Il latte viene anche facilmente sofisticato, specie allo scopo di ridare l'aspetto e la densità al latte stesso, quando è stato scremato od annacquato.

In tal caso la prima ricerca da fare è quella che riguarda il numero dei globuli lattei.

Dal latte non sedimentato se ne preleva con una pipetta una goccia che si deposita sopra un portoggetti e si copre con un coproggetti, badando di non comprimerla. Si attende quindi che tutti i globuli lattei vengano a galla e occupino lo strato superiore del liquido e quindi si procede all'esame.

Usando sempre la stessa pipetta e un vetrino coproggetti delle stesse dimensioni, fatti numerosi raffronti fra latte normale, scremato ed annacquato, si riesce a poter dare un giudizio. Per essere esatti è però meglio ricorrere ad un apparecchio simile al contaglobuli Thoma-Zeiss detto citogalattometro del Guida.

Il Guida diluisce 1 p. di latte in 19 p. di acqua e fa un preparato servendosi di una specie di vetrino di Ranvier come portoggetti, in modo da poter avere sotto al campo microscopico una lamella di liquido latteo di uno spessore determinato. All'apparechio sono unite anche sei figure che indicano i vari reperti di globuli nel latte, dal magrissimo al normale, a quello ricco di sostanze grasse.

Secondo il Pasquini, nel latte normale i globuli del latte stanno fra di loro in rapporto numerico costante, cioè i globuli grandi sono circa un terzo dei piccoli. Nel latte scremato non si trovano più i globuli grandi ed i medî sono ridotti più o meno a seconda della scrematura, sino anche a sparire. Nel latte annacquato si trovano invece tutte e tre le specie di globuli; però mentre nel latte normale essi sono addossati gli uni agli altri, in maniera da non lasciare spazi tra di loro, superiori al diametro di due globuli grandi e sono anche in alcune aree disposti a strati; nel latte annacquato, invece, gli spazi sono sempre più o meno grandi.

Fatte queste osservazioni, si può passare a ricercare le supposte sofisticazioni le quali generalmente consistono nell'aggiunta di *amidi* e principalmente di amidi di cereali, che sono benissimo riconoscibili all'esame microscopico (v. cap. *Farine*). Si possono ad ogni modo mettere subito in evidenza, anche senza di questo, raccogliendo il deposito formatosi in un bicchiere a calice in cui si sia versato il latte con l'aggiunta di un poco di acqua iodata la quale colora in bleu tutti gli amidi, lasciando scolorati i globuli del latte.

L'aggiunta di *gomma dragante*, nel caso non sia completamente sciolta nel latte, si dimostra per la presenza di fiocchi biancastri, o per quella di finissimi puntini ammassati che assumono coll'iodio e l'acido solforico una tinta bleu-violetta. La prova va possibilmente fatta sotto al campo microscopico.

L'aggiunta di *sostanza cerebrale* spappolata, è eccezionale e forse inesistente oggidì: ad ogni modo, si rivela dai frammenti di fibre nervose, dalle cellule caratteristiche della sostanza cerebrale, da una serie di granulazioni amorfe che si trovano mescolate ai globuli del latte.

6. ESAME MICROSCOPICO PER RICONOSCERE SE IL LATTE CONTENGA DEL SUDICIUME. — Si sa che un criterio sicuro per giudicare della conservabilità maggiore o minore del latte può aversi della quantità d sudiciume (lo *Schmutz* dei Tedeschi) che esso contiene e che tutto o la massima parte del sudiciume, che abitualmente si trova nel latte del mercato, è costituito da feci di vacca, colle quali vi arrivano in quantità grandissima quei germi che ne producono le alterazioni spontanee (Mazza e Gavelli).

Infatti si può riconoscere subito il latte sudicio per la presenza di elementi vegetali (fibre, trachee, elementi cellulari contenenti clorofilla), uova di vermi, ecc., tutti o quasi provenienti dalle feci delle vacche.

Per metterli in evidenza si esamina il sedimento di latte versato in un bicchiere o il deposito del medesimo centrifugato, oppure si lascia sedimentare il latte per 2 ore almeno in un cilindro graduato (1 litro di latte possibilmente), si decanta una buona parte del latte, il resto si diluisce con molta acqua, sino a portare il volume del liquido a quello primitivo del latte e si lascia riposare, poi, formatosi un deposito, si decanta, si diluisce ancora, e si torna a lasciar formare un nuovo deposito. Così si ripete l'operazione per tre volte, esaminando alla fine di ognuna, il deposito al microscopio. Si può anche stabilire in volume il quantitativo delle materie estranee. Va da sè, che invece di lasciar riposare il latte si può centrifugare e che il sudiciume si può anche raccogliere filtrando il latte sopra un filtro di cotone.

7. ESAME MICROSCOPICO PER RICONOSCERE DA QUALE ANIMALE PROVENGA IL LATTE. — Per riconoscere la provenienza del latte, in questi ultimi tempi, si è utilizzato il procedimento sierodiagnostico.

Il Bordet ha infatti veduto che se si inoculano, a diverse riprese, dei conigli nel peritoneo, con un dato latte (scaldato a 63° per un'ora), nel siero di sangue dell'animale, aggiunto *in vitro* con alcune gocce del latte stesso (10-15 gocce a 3 cmc. di siero), si formano subito dei granuli e poi dei fiocchi e il liquido si separa in due parti, l'una limpida e l'altra costituita dal deposito dei fiocchi riuniti. Nel siero di coniglio non trattato, invece, non si produce alcun fenomeno: lo stesso si dica se il latte aggiunto proviene da un animale di specie diversa da quello dal quale proviene il latte inoculato.

Formaggio e burro.

Nel formaggio e nel burro possono ricercarsi mediante l'esame microscopico le sostanze che sono state aggiunte a scopo di frode, come amidi, sostanze minerali, ecc., nonchè i microrganismi che importano dal punto di vista dell'igiene.

Per l'esame microscopico del *formaggio* si può stemperare un po' del materiale in acqua distillata e parte esaminarlo direttamente al microscopio, parte lasciarlo seccare sul vetro portoggetti che poi si mette in un recipiente con etere, col quale si lascia in contatto per un quarto d'ora, quindi si estrae, si lascia asciugare e si colora con soluzione di Ziehl o di Ehrlich.

Ma procedendo in questo modo è facile comprendere come non si possa giungere sempre ad emettere un responso certo. È meglio ridurre prima il formaggio a poltiglia, grattugiandolo se è duro, pestandolo in un mortaio se è molle e poi aggiungendovi acqua distillata e sterilizzata, decantare la parte liquida e centrifugare o lasciare in riposo, in bicchiere a calice.

Si può allora introdurre una pipetta al fondo, dove rimane il residuo, che si aspira e si esamina al microscopio, all'ingrandimento di 300-400 diametri, una goccia di materiale.

L'esame microscopico del formaggio può rivelare la presenza di muffe, di blastomiceti, di batteri, senza che questi parlino contro l'uso alimentare dello stesso. Si sa infatti che ogni formaggio deve considerarsi come una coltura di germi che prima e durante la maturazione si sviluppano rigogliosamente.

Così prima che questo avvenga si trovano diverse varietà di penicilli (l'albo, il glauco, il candido) dei saccaromiceti, degli oidî; quando si forma il così detto rosso del formaggio si trovano batteri, numerosi cocchi e bacilli che non sono cromogeni nei terreni di coltura; nel periodo della maturazione sono stati descritti anche molti anaerobi (secondo Rodella ogni grammo di formaggio ne contiene più di 100). Alcuni ritengono anzi (Freudenreich) che essi siano specifici di questo processo, ciò che altri non ammette (Rodella). Alcuni di essi come il *Paraplectium foetidum* di Weigmann, il *Clostridium foetidum lactis* ecc., hanno la proprietà di dare alle caseine e alle materie albuminoidi un odore di formaggio: ammettesi che abbiano, con tutta probabilità, un'azione nel processo di maturazione.

In mezzo a così grande abbondanza di muffe, blastomiceti e batteri aerobi ed anaerobi, è quindi molto difficile potersi orientare quando si vogliano ricercare gli agenti di particolari alterazioni del formaggio: certo è impossibile farlo col solo esame microscopico.

Ad ogni modo ricorderò che alterazioni dei caratteri organolettici, come il gusto di rapa, l'odore di caprone, di stalla, di vacca, sono stati ritenuti legati a latti in cui si erano sviluppati germi del gruppo del *Coli*, germi che sarebbero ingeriti dagli animali insieme agli alimenti essendo comuni a ritrovarsi sull'avena, orzo, mais, ecc. Al gusto di rapa contribuirebbe però anche l'*Actinomyces odorifera* e il *Penicillium brevicaule*. Così il gusto amaro del formaggio, sarebbe sostenuto dai bacilli della fermentazione lattica insieme al *B. speciale proteolizzante di Ekles* col quale anche si potrebbe riprodurre la malattia.

Quanto ai germi patogeni che possono ritrovarsi nel formaggio, vale quanto si è detto per il latte. La loro ricerca si può fare come si è indicato per l'esame microscopico, adoperando però mortaio, tubetti, pipette, acqua distillata, tutti sterilizzati. E l'acqua di lavaggio, ottenuta dall'ultimo procedimento, si inocula negli animali o si semina nei terreni di coltura come per il latte.

Si può anche, dopo trattato con acqua il formaggio poltigliato e centrifugatolo, applicare il metodo dell'Ilkewitsch, ossia trattarlo con una soluzione di fosfato sodico, aggiungervi 6 cmc. di etere e poi il materiale, dopo centrifugato, inocularlo o seminarlo.

Riguardo al *burro*, quando si sospetti sia sofisticato con l'aggiunta di sostanze estranee (indipendentemente dal grasso di bue, che si dia-

gnostica colle prove chimiche e col polariscopio), si può ricorrere al procedimento dell'Husson.

A tal uopo si aggiungono a circa 1 gr. di burro, 10 gr. di glicerina, si fonde il tutto a bagnomaria, si agita bene, e poi si aggiungono 10 cmc. di alcool a 90° e di etere a 66°. Quindi si pone il recipiente contenente il miscuglio in un bagnomaria a 25°. A poco a poco si separano due strati: il superiore fatto di alcool ed etere, l'inferiore di glicerina con un po' di alcool. Fra i due strati si depositano gli amidi, mentre gli altri elementi che eventualmente vi possono essere stati aggiunti, come polveri minerali, precipitano al fondo. Con una pipetta si raccolgono e si esaminano facendo preparati microscopici in acqua, che si osservano all'ingrandimento di 300 diametri.

Si può anche usare lo stesso procedimento del Fiore, indicato per il grasso, cioè trattare il burro a caldo con acqua ed esaminare il residuo formatosi nel bicchiere a calice.

Nel burro, ancora più che nel formaggio, si è fatta la ricerca dei germi patogeni che possono trovarsi nel latte e specialmente il bacillo della tubercolosi, essendosi potuto assodare che le manipolazioni che subisce il latte nella burrificazione non giungono mai ad eliminare completamente i bacilli tubercolari. (Guerin).

Inoltre è del pari accertato che la crema ne contiene da 100 a 500 volte più del latte mescolato, specie se la crema è ottenuta per centrifugazione, giacchè durante questa operazione la maggior parte dei germi passa nella crema. Nel burro preparato da crema si trovano quindi più batteri della tubercolosi che nel latte col quale viene fatto il burro.

I germi patogeni infine si è dimostrato che mantengono a lungo la loro virulenza e vitalità anche se il burro è salato. Il B. della tubercolosi è stato trovato in queste condizioni anche dopo 99 giorni, quello del colera dopo un mese, il B. del tifo dopo tre settimane.

Qualora nel burro si sospetti la presenza del *bacillo della tubercolosi* occorre fonderne una certa quantità, poi mentre ancora è caldo centrifugarlo, decantare, trattare il deposito con etere, lasciare ancora depositare e poi, dopo decantazione dell'etere, riprenderlo con alcool, lasciarlo essiccare sopra un vetrino portoggetti e colorarlo coi metodi di colorazione del bacillo della tubercolosi.

Anche in questo caso bisogna però badar bene di non confondere il *bacillo della tubercolosi* coi *bacilli pseudo-tubercolari*, per cui occorre inoculare parte del residuo non trattato con etere e con alcool in animali sensibili, come si fa nel caso in cui si tratti di latte.

È stato anzi osservato che i bacilli acido-resistenti inoculati col burro fuso possono, anche nei rispetti della loro azione verso gli animali, differenziarsi meglio tra di loro. Così il *Korn I* e il *B. di Markl* producono nelle cavie una peritonite essudativa, il *B. della Rabinowitsch*, il *Korn II*, il *Tobler I* producono una peritonite essudativa ed un'infezione setticemica pur rimanendo incapaci di produrre lesioni in serie in piccole dosi; il *Mistbacillus* di Möller, il *B. di Karl*, il *Tobler III* e *V* posseggono invece questa

proprietà senza ricorrere all'inoculazione in serie di grandi quantità di materiale.

Inoltre essi sono più facilmente coltivabili e le colture permettono nuove differenziazioni. Così il *B. della Rabinowitsch* produce patine rosso-mattone, il *Mistbacillus di Möller* patine brillanti, come verniciate il *Karl* e il *Tobler II* patine verrucose; il *Korn III* e *V* patine giallo-mattone; il *Timoteobacillus* patine giallo-dorate.

In quanto alla presenza di altri germi patogeni, si fonde il burro e lo si tratta come il latte.

Bisogna però, quando si voglia fare la ricerca di alcuni germi appartenenti al gruppo *coli*, tenere presente che essi non mancano mai, secondo alcuni studiosi, anche nei burri più fini, sebbene vi si trovino in minor numero, e quindi dalla loro presenza non esser tratti a ritenere insalubre il burro, se non dopo aver con piena sicurezza fatta la diagnosi della specie batterica e aver assodato trattarsi realmente di germi capaci di produrre infezioni nell'uomo.

Il burro come il formaggio può presentare anche delle alterazioni nei suoi caratteri organolettici. Una di esse, studiata dal Gasperini, può mettersi in rilievo coll'esame microscopico, essendo prodotta dal *Penicillium purpuricogenum* e dal *Penicillium lacteopurpurinum.*

Per l'esame del burro sofisticato per il quale necessiti ricorrere all'esame per mezzo della luce polarizzata, vedi *Chimica applicata all'Igiene.*

ESAME MICROSCOPICO DELLE FARINE, DEL PANE E DELLE PASTE

Farine.

I semi di varie piante (specialmente quelli delle graminacee e delle leguminose) sono adoperati come sostanza alimentare, ed a tale scopo, mediante opportuni trattamenti, viene dai medesimi separata la parte legnosa da quella più facilmente digeribile costituita dai granuli di amido: essa rappresenta la così detta farina.

La diffusione di questo materiale alimentare, proveniente specialmente dai semi delle graminacee, divenuto di prima necessità, obbliga l'igienista a portare sulle farine una rigorosa sorveglianza. Ed è appunto colle indagini microscopiche sulle medesime che è lecito:

riconoscere da quale vegetale provenga una farina o identificare la farina;

riconoscere se in una farina esistano elementi provenienti da semi nocivi;

riconoscere se la farina sia inquinata da parassiti.

I. Esame microscopico per riconoscere da quale vegetale provenga una farina. — Esso si fonda sull'esame dei granuli di amido, del reticolo cotiledonare, dei peli e delle crusche.

1. *Esame dei granuli di amido.*

a) *Caratteri comuni ai vari granuli.*

I granuli di amido provengono da semi ove trovansi accumulati nel tessuto amidifero, il quale rappresenta lo strato più interno del seme e propriamente quello che sta all'interno dello strato delle cellule aleuroniche: questo poi, insieme a tutti gli altri strati sovrastanti, costituisce la così detta crusca.

Essi sono rappresentati da una serie di corpicciuoli, i quali, a seconda del vegetale da cui provengono, hanno caratteri diversi per forma, grandezza, aggruppamento, stratificazione, ilo, comportamento alla luce polarizzata, all'osservazione in campo oscuro e agli agenti chimici.

In base alla forma, i granuli sono stati riuniti da Di Vestea nei quattro tipi morfologici seguenti:

Tipo globoso lenticolare: segala, frumento, orzo;

Tipo globoso allungato: leguminose, fecole di patate, arrow-root (Antille, Maranta, Indie), fecola di tolomane, ecc.;

Tipo globoso poliedrico: mais, dura, grano saraceno, avena, riso;

Tipo globoso poliformo: castagne, arrow-root (Travancore, Taïti), sagou, tapioca, Moussache, ecc.

In base alla grandezza media massima, i granuli degli amidi più comuni possono disporsi in una serie discendente a cominciare dall'amido di patata, che è il maggiore, sino a finire a quello del riso che è il più piccolo (non tenendo conto dei granuli composti di quest'ultimo e di quelli dell'avena).

Patate, sino a 100 μ e più.
Leguminose, sino a 60 μ e più.
Segala, sino a 53-57 μ.
Frumento, sino a 43-47 μ.
Orzo, sino a 33-37 μ.
Mais, sino a 30 μ.
Castagne, sino a 30 μ.
Grano saraceno, sino a 20 μ.
Dura, sino a 33-41 μ.
Avena, sino a 9 μ.
Riso, a 7 μ.

In base al modo di riunirsi fra di loro, i granuli di amido si distinguono in semplici e composti.

Sono semplici i granuli di tutti gli amidi enumerati, meno quelli dell'avena e del riso: questi si presentano isolati e riuniti in ammassi, e sono detti granuli composti od a mosaico; però i piccoli granuli della patata e del frumento possono qualche volta trovarsi riuniti a tre, come ancora i granuli del mais possono trovarsi riuniti ad ammassi pavimentosi, i quali però non hanno nulla di comune coi veri granuli composti.

In base alla stratificazione non è certamente possibile stabilire dati invariabili riguardo ai vari granuli; però, si può ritenere che esistano granuli con striatura:

sempre visibile: leguminose, patate;

ora visibile, ora no (alla periferia): segala, frumento, orzo, castagne, mais;

invisibile: avena, riso.

In base ai caratteri dell'ilo, non è possibile stabilire raggruppamenti assolutamente costanti; si può soltanto ritenere che esistano granuli con ilo:

generalmente sempre visibile: fecole, segala, leguminose, orzo, mais;

spesso non visibile: frumento, castagne;

invisibile: avena, riso.

In base al comportamento alla luce polarizzata dei granuli di amido più grandi è permesso di distinguerli nei due gruppi seguenti:

Attivi

in campo oscuro e chiaro: leguminose, patate (fig. 195, *a*) ed anche a volte qualche granulo di altre farine, come p. es. di mais;



Fig. 195.

in campo oscuro e non chiaro: frumento (fig. 195, *b*), segala, orzo, mais, dura, grano saraceno, grossi granuli della castagna;

inattivi in campo oscuro e chiaro: avena (?), riso.

Per l'esame dei granuli d'amido alla luce polarizzata si applicano al microscopio due prismi di Nicol (di spato d'Islanda, quindi birefrangenti), di cui uno in luogo del tubo portadiaframmi, annesso al tavolino del microscopio, e l'altro al disopra dell'oculare. Quest'ultimo prisma prende il nome di prisma analizzatore o superiore, l'altro di prisma polarizzatore od inferiore. Il prisma superiore si può far girare attorno al proprio asse, dimodochè è possibile ottenere a volontà l'incrocio di due prismi.

Diconsi inattive quelle sostanze che rimangono oscure a campo oscuro ed attive quelle che, pure essendo il campo oscuro, presentansi solo parzialmente tali; dimodochè si hanno in esse parti chiare e parti oscure. I tratti

neri si osservano negli amidi così detti attivi, ed hanno generalmente la forma di una croce (appunto perchè gli amidi vanno considerati come degli sferocristalli risultanti dalla riunione di aghi birefrangenti)

Orbene, dei granuli d'amido osservati al micropolarizzatore, ve ne hanno alcuni i quali, sì in campo oscuro che in campo chiaro, presentano una croce rifrangente, le cui branche sono regolari, salvo quelli delle patate che le presentano iperboliche; ve ne hanno altri che presentano questa croce solo in campo oscuro, senza caratteristiche speciali, eccezion fatta dell'amido del grano turco, la cui croce ha gli estremi allungati e brillanti, come ve ne hanno ancora alcuni che non presentano alcuna croce nè in campo oscuro, nè in campo chiaro.

In base all'osservazione dei granuli osservati coll'illuminazione in campo oscuro ottenuto con uno dei dispositivi per la visione ultramicroscopica, (ocul. 12 comp., obbiettivo a secco 6 = ingrandimento 638 diametri) il Trincas ha trovati i seguenti caratteri differenziali tra le varie specie di granuli.

Frumento (fig. 196): contorno rifrangente di eguale spessore in tutto il circuito; nei granuli più grossi stratificazione periferica, data da due o tre anelli sottilissimi rifrangenti; contenuto scuro, sfumantesi verso la periferia: i granuli piccoli rotondi o sferici con qualche lato più appiattito.

Orzo (fig. 198): contorno splendente d'eguale spessore in tutto il circuito nei granuli rotondi, di spessore ineguale nei non rotondi, incompleto nei più grandi; nell'interno dei granuli grandi, ma non raggiungenti i diametri massimi, una zona sfumata racchiudente uno spazio scuro, nel quale a volte un punto splendente; tra la zona sfumata e il bordo splendente, una striatura concentrica; nei granuli di massime dimensioni il bordo splendente appena delineato sottilissimamente e tutto il globulo scuro; i granuli più piccoli angolosi, molto rifrangenti nel loro contenuto, con punti più ispessiti e più rinfrangenti in corrispondenza coi lati piani.

Segala (fig. 197): contorno rinfrangente di eguale spessore in tutto il circuito; contenuto differenziato nelle seguenti parti: uno strato anulare, subito dopo il bordo del granulo, meno rifrangente, con alla sua parte interna finissime raggiature, racchiudente una massa oscura con ancora un anello meno rifrangente, nel quale il centro del granulo è rappresentato da un punto oscuro, da cui si dipartono piccole raggiature di ineguale diametro non oltrepassanti il secondo anello interno; i granuli piccolissimi arrotondati con anello periferico fortemente illuminato e contenuto scuro.

Mais (fig. 199): contorno molto rifrangente non regolare, perchè più ispessito nei punti corrispondenti alle parti più angolose dei granuli; innalzando la vite micrometrica, il fenomeno della discontinuità del bordo più evidente; e, attorno all'anello periferico rifrangente, un altro anello sfumato per effetto ottico; ilo puntiforme o rappresentato da

linee divergenti attorno ad un punto centrale, come un asterisco; i granuli piccoli assai più rifrangenti.

Leguminose (fig. 200 e 200-*bis*): contorno ben delimitato rifrangentissimo; internamente un anello sfumato delimitante uno spazio nero; ilo longitudinale o rappresentato da sottili linee costituenti un ammasso ri-


Fig. 196.

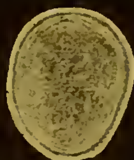

Fig. 197.


Fig. 198.


Fig. 199.


Fig. 200.


Fig. 200 *bis*.


Fig. 202.


Fig. 201.

frangente, come rappresentato da tanti cristalli aghiformi irregolarmente riuniti o occupante tutto il granulo, con l'aspetto di una spina o di una piuma, a bordi rifrangenti, irradiantesi a raggi di ruota dall'anello rifrangente nella zona sfumata.

Patate (fig. 201): contorno rifrangente, all'interno del quale un largo strato rifrangente sfumato limitante uno spazio centrale ovulare nero, l'ilo eccentrico visibile solo in alcuni granuli sotto forma di un piccolo

punto sfrangiato nel tratto oscuro, dall'aspetto di uno asterisco o sotto forma semplicemente di un piccolo punto; alzando la vite micrometrica, la parte sfumata si mostra distaccata dall'anello rifrangente periferico, costituendo una specie di ciambella nell'interno dei granuli.

Grano saraceno: contorno rifrangente continuo in tutto il circuito, internamente al quale, in alcuni granuli, dei tratti splendenti occupanti una porzione angolare; questi tratti, alzando la vite micrometrica, appaiono allontanarsi dal bordo splendente; parte centrale discoidale allungata, un po' rifrangente, racchiudente uno spazio scuro della stessa forma.

Avena (fig. 202): contorno rifrangente in alcune parti rispondenti ai lati e non ai punti angolosi come nel mais: contenuto scuro senza alcun carattere particolare.

Riso: contorno rifrangente in parte e specialmente nei punti rispondenti alle parti angolose: i granuli piccoli rifrangenti in totalità.

In base al modo di diportarsi dei granuli d'amido verso i vari reagenti va ricordato il colore bleu-violetto che assumono in contatto con una soluzione iodica; il rigonfiamento, la dissoluzione che subiscono nella potassa (per es., i granuli di amido di patata assumono l'aspetto di grosse vescicole); le modificazioni che assumono in contatto con l'acqua calda (sfaldamento dei granuli del frumento, trasformazione dei granuli di segala discoidali nei granuli a ferro di cavallo, ecc.).

In questi ultimi tempi è stato poi studiato il modo di diportarsi degli amidi delle principali farine (frumento, segala, orzo, mais) verso gli acidi, gli alcali, i mordenti, le sostanze maceranti, le sostanze coloranti (Casagrandi e Clavenzani).

Tra i vari acidi inorganici, esercitano un'azione distruttrice potente il solforico, il cloridrico, il nitrico ed il cromico: gli altri, compreso il fosforico, non hanno azione sensibile. Gli acidi stessi, al disotto delle proporzioni del 50 per cento, salvo il cloridrico, pur mostrando la medesima azione distruttrice sui granuli del frumento, dell'orzo e della segala, hanno azione più debole verso quelli di mais, sia bianco, sia giallo. E precisamente l'acido solforico conc. puro nella proporzione di 35-40 p. di acido e 100 p. di acqua; l'acido nitrico puro nella proporzione di 20 p. di acido e 100 p. di acqua; il cloridrico nella proporzione del 25 per cento (sebbene quest'ultimo non così marcatamente come gli altri tre), riescono a distruggere tutti i granuli del frumento, dell'orzo, della segala, rigonfiano ed alterano i grossi granuli di mais, lasciando intatti i medî e i piccoli.

La maggior parte degli acidi inorganici non fa che rigonfiare i granuli.

In quanto agli alcali, l'ammoniaca non spiega alcuna azione; invece, la soda e la potassa distruggono, se concentrate anche mediocremente, i diversi granuli. Nelle proporzioni dell'1.8 per cento la potassa e in quelle del 0.75-1 per cento la soda, distruggono solo quelli di frumento,

segala, orzo, lasciando intatti quelli del mais e più se di mais bianco che di mais giallo.

Tra i mezzi maceranti, la miscela di Schutze distrugge tutti i granuli; diluendola almeno col doppio di acqua, i granuli di mais resistono di più.

Tra i vari colori di anilina alcuni non colòrano gli amidi, altri li colorano lievemente ed uniformemente, altri intensamente, ed altri colorano preferibilmente quelli di mais, come il rosso-magenta, il giallo-acido G., la dahlia, ecc.

b) Caratteri speciali dei principali granuli.

Tecnica dell'esame. — Generalmente per studiare i granuli di amido si pone un poco di farina in una goccia d'acqua o di glicerina diluita. che si fa spesso anche leggermente iodata e si sottopone il preparato all'esame microscopico, osservandolo con lenti a secco (Oc. 3, obb. 6, Kor.). Però questo metodo non può dare risultati conformi al vero, allorchè si tratta di rilevare la grandezza dei granuli stessi, poichè essi non vengono egualmente idratizzati. Occorre quindi che precedentemente il materiale (bastano pochi pizzichi di amido) venga versato in un bicchiere a calice pieno d'acqua, ed allorchè nel fondo del vaso si è formato un certo deposito, venga raccolto mediante pipetta e sottoposto all'esame. Sarebbe utile anche far passare la farina successivamente attraverso a tre stacci a maglie sempre più fine (mm. 0.75-0.50-0.25) e raccogliere la farina che rimane sui vari stacci, esaminandola separatamente: ma nella pratica, questo procedimento non si dimostra strettamente necessario.

Recentemente si è proposto dal Pinzani anche l'esame dei granli in inchiostro di Cina (Günther) diluito in acqua distillata e sterilizzata nelle proporzioni di 1 a 10, o nel comune inchiostro diluito in acqua o meglio in glicerina nelle proporzioni di 1:3 con qualche goccia di una soluzione *diluitissima* di soda o potassa. Si versa sul portaoggetti una goccia di inchiostro e in questa goccia si stempera un po' della farina in esame: quindi si copre col coprioggetti e si schiaccia tra il pollice e l'indice « con molta delicatezza per non frangere i granuli » in modo da rendere l'emulsione omogenea. Si esamina con gli ingrandimenti soliti (Oc. 3, obb. 5-6 Kor.) e se il preparato è bene riuscito, sul fondo bruno dell'inchiostro di Cina si vedono spiccare i granuli di amido incolori.

Il metodo serve specialmente per metter in evidenza i granuli grandi: i piccoli non spiccano sul fondo oscuro e restano confusi. Per i granuli composti va però benissimo perchè rende assai più evidenti le linee che dividono uno dall'altro i singoli granellini che li compongono.

Singoli granuli d'amido. — Nella descrizione di questi granuli credo utile dal punto di vista didattico incominciare da quei granuli che presentano caratteri completi e via via terminare con quelli che li presentano meno completi.

1° *Amido di patate* (fig. 203). — Globuli ovoidi o piriformi di grandezza variabile sino a 100-200 μ, generalmente isolati, con striatura sempre visibile, concentrica attorno all'ilo eccentrico, per lo più punti-

forme; attivi alla luce polarizzata in campo oscuro e chiaro; coll'illuminazione in campo oscuro, contorno rifrangente, nel cui interno una nettissima zona sfumata racchiudente uno spazio scuro, in cui qualche

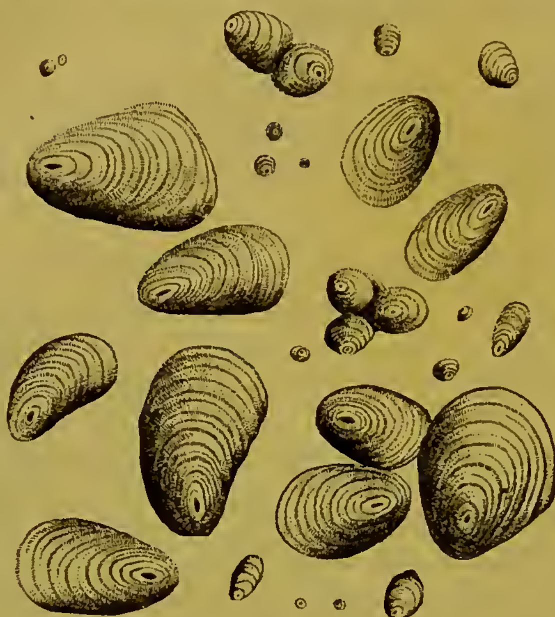


Fig. 203.

volta si vede anche l'ilo; la zona sfumata è nettamente delimitata anche nell'interno.

2° *Amido di leguminose* (fig. 204). — Globuli reniformi ed ovoidi, di grandezza variabile sino a 80-90 μ, isolati, con striatura periferica,



Fig. 204.

con ilo centrale rappresentato da una fessura longitudinale, sfrangiata agli estremi; attivi in campo oscuro e chiaro; coll'illuminazione in campo oscuro, contorno rifrangente racchiudente una zona sfumata, internamente alla quale sta l'ilo rifrangente lineare o piumato.

3° *Amido di segala* (fig. 205). — Globuli sferoidali appiattiti, isolati, alcuni grandi sino a 57 μ, altri piccoli, con striatura per lo più non visibile, a volte solo alla periferia, con ilo centrale, ma non sempre, in tutti i granuli, raramente puntiforme, per lo più crociato, tricorno o

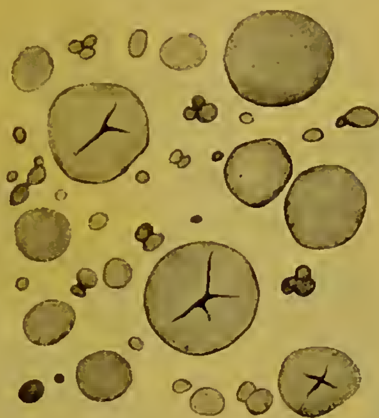


Fig. 205.

stellato; attivi in campo oscuro; coll'illuminazione in campo oscuro contorno rifrangente eguale in tutti i punti, all'interno del quale uno strato anulare meno rifrangente con finissime raggiature e racchiudente una massa scura, dal centro della quale si dipartono anche delle piccole raggiature di ineguale diametro.

4° *Amido di frumento* (fig. 206). — Globuli rotondi, visti di fronte, a lente biconvessa visti di lato, grandi sino a 47 μ, isolati, con striatura raramente visibile alla periferia, con ilo quasi costantemente invisibile, attivi alla luce polarizzata solo in campo oscuro; coll'illuminazione in campo oscuro, contorno rifrangente di eguale spessore in tutto il circuito e presenza di una striatura concentrica all'interno del contorno medesimo.

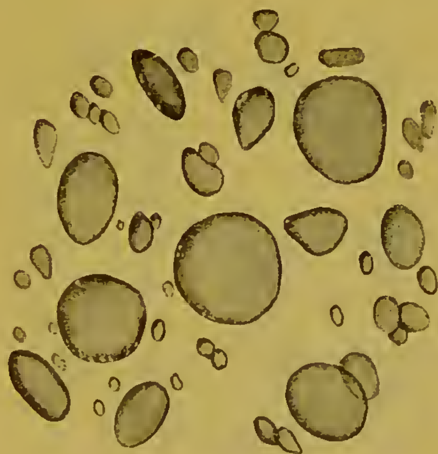


Fig. 206.

5° *Amido di orzo* (fig. 207). — Globuli rotondi od ellittici con tendenza ad assumere la forma irregolarmente tondeggiante, a bordi alquanto sinuosi ed ondulati, grandi sino a 37 μ, isolati, con striatura



Fig. 207.

spessissimo invisibile anche alla periferia; attivi alla luce polarizzata solo in campo oscuro; coll'illuminazione in campo oscuro contorno rifrangente di spessore ineguale in tutto il circuito, nelle forme decisamente non rotonde; zona sfumata all'interno racchiudente uno spazio scuro.

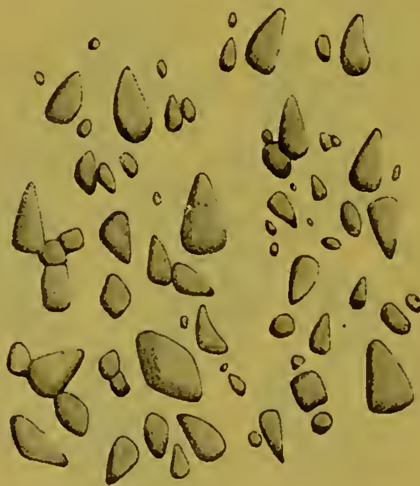


Fig. 208.

6° *Amido di castagne* (fig. 208). — Globuli polimorfi (lenticolari, poliedrici, piriformi, a goccia, gibbosi), grandi fino a 25 μ, isolati o riuniti a gruppi di 2-3, con stratificazione ed ilo poco evidenti e attivi alla luce polarizzata soltanto i più grossi.

7° *Amido di mais* (fig. 209). — Globuli nettamente poliedrici, quelli del mais giallo (fig. 209, *a*), ad angoli smussi quelli del mais bianco (fig. 209, *b*), grandi quelli del mais giallo sino a 30 μ (in media 22-27), ma la maggior parte 15-20 μ, isolati e riuniti a grandi ammassi, con stratificazione per lo più invisibile, con ilo in molti puntiforme od a

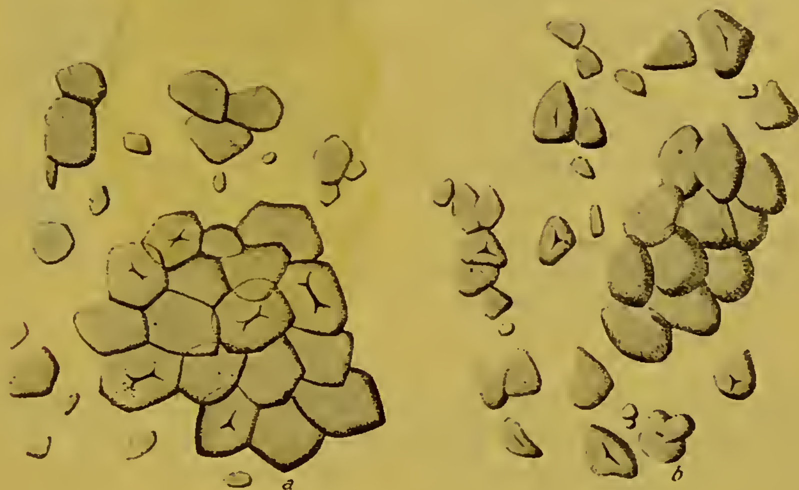


Fig. 209.

croce; attivi alla luce polarizzata in campo oscuro e taluni, debolmente, anche in campo chiaro; coll'illuminazione in campo oscuro contorno rifrangente più spesso nei punti angolosi dei granuli.

8° *Amido di dura* (fig. 210). — Globuli irregolarmente poliedrici ad angoli un po' smussi, raramente con stratificazione visibile, con ilo profondamente incavato, triraggiato, a croce, stellato o lineare, grandi da 4 a 41 μ, cioè i granuli grandi μ 33-41, i medî 13-18, i piccoli 3-7; attivi in campo oscuro.

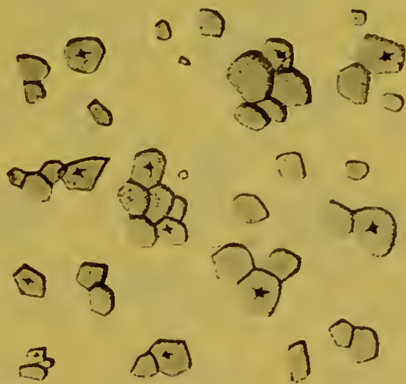


Fig. 210.

9° *Amido di grano saraceno* (fig. 211). — Globuli rotondeggianti o irregolarmente poliedrici, isolati e riuniti ad ammassi o in serie, generalmente aventi una forma allungata e spesso l'apparenza di una cavità

centrale, alcuni grandi 4-8 μ, altri 10-15 e tutt'al più 18-20 μ; attivi in campo oscuro alla luce polarizzata.



Fig. 211.

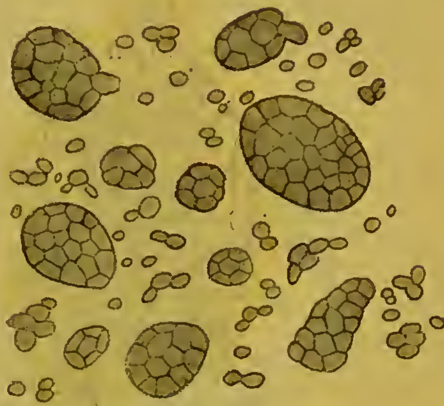


Fig. 212.

10° *Amido di avena* (fig. 212). — Globuli poliedrici, isolati, grandi 9 μ o riuniti ad ammassi rotondi od ovoidali grandi 42-60 μ, detti granuli a mosaico, senza stratificazione nè ilo visibili; inattivi quasi completamente alla luce polarizzata.

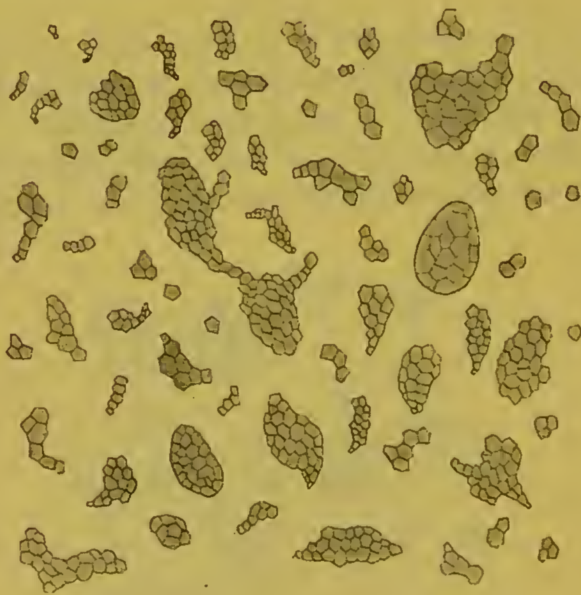


Fig. 213.

11° *Amido di riso* (fig. 213). — Globuli poliedrici isolati o riuniti in granuli a mosaico della forma del reticolo cotiledonare cioè ovoidale, gli uni e gli altri più piccoli di quelli della avena, senza stratificazione nè ilo visibili, completamente inattivi alla luce polarizzata.

2. *Esame del reticolo cotiledonare.* — Il reticolo cotiledonare costituisce la trama dell'albume e può paragonarsi ad un cribro a fori di varia forma, dentro i quali si trovano i granuli di amido. Di esso si

rinvengono i resti nelle farine, non potendo venir separato dall'amido mediante la macinazione.

Per studiarlo si pratica la setacciatura della farina attraverso a tre stacci a fori sempre più stretti (mm. 0.70-0.50-0.25), si raccolgono le massette rimaste sull'ultimo staccio e si trattano in un vetro da orologio a freddo con potassa all'1 % od a caldo con carbonato sodico al 10 % fino a che sono divenute trasparenti e si sottopongono allo esame microscopico, schiacciandole tra il vetrino coproggetti e il portaoggetti in una goccia di glicerina diluita.

Si può anche facilitare la ricerca dei reticoli, trattando una certa quantità di farina con acido nitrico al 50 %. Così si distruggono gli amidi e si forma un deposito che si raccoglie con una pipetta. In questo deposito si trovano i reticoli intatti.

Il reticolo amilifero presenta caratteri diversi a seconda del seme da cui proviene, i quali caratteri si rilevano dalla forma delle maglie, dallo spessore delle pareti, dalla resistenza di queste alla potassa.



Fig. 214.

Riguardo alla forma delle maglie, il reticolo amilifero può essere (fig. 214):

1° a maglie tendenti alla forma rotondeggiante (frumento, orzo, fig. 214 *a*);

2° a maglie tendenti alla forma quadrangolare (segala, fig. 214, *b*);

3° a maglie tendenti alla forma quadrata o poliedrica (mais, riso, fig. 214, *c*);

4° a maglie ovalari, ma irregolari (leguminose, fig. 214, *d*).

Riguardo allo spessore delle pareti il reticolo amilifero può presentarsi:

1° a pareti sottili (dura, riso, frumento, segala, orzo);

2° a pareti spesse (leguminose e mais).

Il reticolo amilifero è poi caratteristico nella dura e nelle leguminose:

1° per la presenza lungo le pareti del reticolo, di nodi rinfrangenti piriformi (dura, fig. 214, *e*);

2° per la divisione del reticolo in tante concamerazioni da membrane perforate e per la presenza di lacune nei punti di divisione dei sepimenti (leguminose).

Riguardo alla resistenza del reticolo amilifero alla *KOH*, il Di Vestea ha potuto osservare che trattando il medesimo con tre soluzioni diverse di *KOH*, l'una al 2 %, l'altra al 5 % e la terza al 10 %, si osserva che alcuni reticoli sono distrutti dalla *KOH* al 2 %, altri dalla *KOH* al 5 %, altri dalla *KOH* al 10 %, ed altri ancora resistono a quest'ultima soluzione.

È così possibile stabilire, in base al comportamento verso la potassa, i quattro gruppi seguenti di reticoli, piuttosto che tre, come originariamente è stato fatto:

TABELLA 88.

Gruppi	Reticoli amiliferi	Potassa 2 %	Potassa 5 %	Potassa 10 %
I gruppo. . .	Frumento	Distrutto rapid.		
	Orzo	Id.		
	Segala	Distrutto lent.		
	Avena	Distrutto rapid.		
	Grano saraceno. . . .	Id.		
II gruppo. . .	Mais giallo e rosso . .	Persistente	Distrutto lent.	
	Riso	Id.	Distrutto	
III gruppo. . .	Mais bianco	Id.	Persistente	Distrutto.
	Dura	Id.	Id.	Id.
IV gruppo. . .	Leguminose.	Id.	Id.	Persistente
	Saggina	Id.	Id.	Id.

Dal modo di diportarsi dei vari reticoli di ciascun gruppo, si possono poi stabilire in qualche caso delle differenze: così il reticolo del frumento e quello della segala sono bensì distrutti ambedue dalla *KOH* al 2 %, però quello del frumento è distrutto rapidamente, anzi lo è già dalla *KOH* all'1.5 %, mentre quello della segala viene distrutto più lentamente e solo dalla *KOH* al 2 %.

3. *Esame microscopico dei peli.* — I peli che si trovano nelle farine provengono dai semi. Benchè la loro ricerca non giovi sempre alla diagnosi, pure è sempre utile tentarla.

Essi si ricercano raccogliendo le particelle che rimangono galleggianti sulla superficie dell'acqua versata in un bicchiere a calice in cui si siano gettati pizzichi di farina o nella schiuma che si forma facendo bollire 2 o 3 gr. di farina in 100 cmc. di acqua, esaminata in una goccia di idrato di cloralio.

Nei peli si studia la lunghezza, lo spessore della parete, la larghezza del lume, la configurazione.

Riferendoci soltanto ai peli del frumento (fig. 215, *a*), della segala

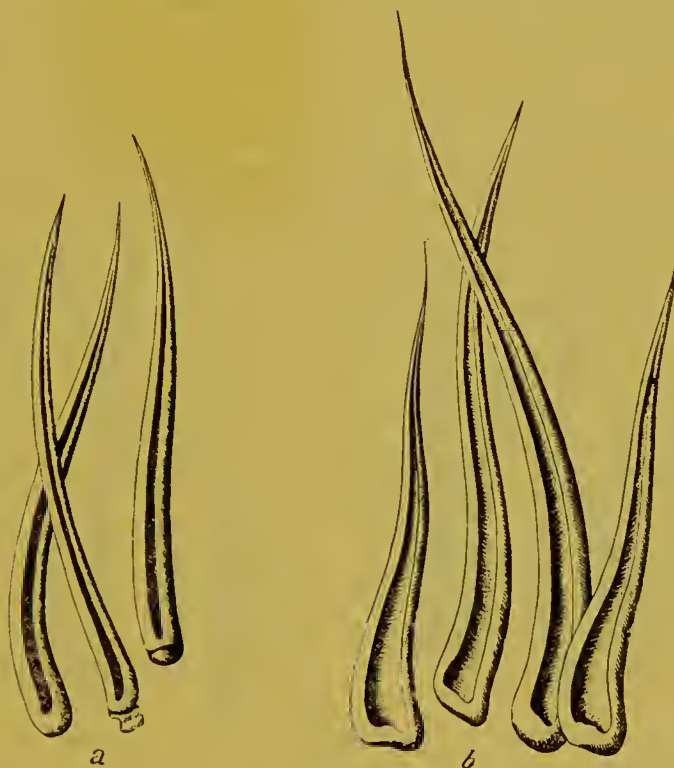


Fig. 215.

(fig. 215, *b*), dell'orzo (fig. 216, *a*), dell'avena (fig. 216, *b*), eccone le dimensioni dalle quali si possono trarre poi i rapporti tra il lume e le pareti, rapporti che si crede generalmente abbiano grande valore nella diagnosi differenziale tra segala e frumento:

Lunghezza dei peli:	
Frumento	μ 120-800
Segala	» 50-420
Orzo	» 60-250
Avena	» 1000
Spessore dei peli:	
Frumento	μ 15-21
Segala	» 9-17
Orzo	» 8-20
Avena	» 25

Spessore delle pareti:

Frumento (più spesse nella segala)	μ	7
Segala (meno spesse nel frumento)	»	3-4
Orzo	»	4
Avena	»	10

Larghezza del lume:

Frumento (meno largo nella segala) . . .	μ	2-7
Segala (più largo nel frumento)	»	2-7
Orzo	»	4
Avena	»	8



a Fig. 216. *b*

Riguardo alla configurazione, i peli sono generalmente rappresentati da cellule molto allungate, terminate a punta e allargate alla base, con lume interno naturalmente di forma conica. Quelli dell'orzo terminano per lo più a punta tronca, per cui, fino a un certo punto, è possibile distinguerli da quelli del frumento e della segala. I peli di quest'ultima per il loro ampio lume non si possono confondere con quelli del frumento. In quanto a quelli dell'avena, sono i più lunghi di tutti e i più grossi: presentano quindi dimensioni superiori a quelle di tutti gli altri peli.

I peli di altre cariossidi differiscono più notevolmente da quelli descritti; così per es. i peli della dura (fig. 231, *a*) sono spesso a lume trasversalmente diviso, perchè pluricellulari; quelli del riso (fig. 231, *b*) sono corti, tozzi, a base cuneata.

4. *Esame microscopico della crusca.*

Le pareti del seme che racchiudono il tessuto amilifero costituiscono la così detta crusca. Di questa se ne osserva sempre qualche traccia nelle farine

anche le più fine, e la sua ricerca è specialmente importante nella diagnosi differenziale dei tre principali cereali: frumento, segala, orzo.

Tecnica d'esame. — Per esaminare la crusca è utile distendere la farina sopra un foglio di carta bianca in sottile strato, aiutandosi collo spigolo di un cartoncino e poi scegliere con una pinza i frustoli.

Questi potrebbero senz'altro esaminarsi al microscopio: però, come ha fatto rilevare il Di Vestea, capitando per solito di piatto, non possono, di regola, comunque rischiarati, far rilevare distintamente quel complesso di note istologiche, che si impara a conoscere in tagli praticati perpendicolarmente alla superficie dei semi.

È meglio quindi praticare delle sezioni includendo la crusca in gelatina glicerinata con l'aggiunta di un po' di acido fenico, perchè non vi si sviluppino microrganismi.

All'uopo si raccoglie la crusca nel modo indicato e la si fa rigonfiare in acqua distillata nel fondo di una provetta, facendo bollire l'acqua per qualche minuto ovvero tenendola a bagnomaria a 50°-55° per qualche tempo. Si versa quindi l'acqua della provetta, si radunano i frustoli di crusca, si spremono fra due fogli di carta bibula e si gettano in una capsulina di vetro o di porcellana munita di beccuccio, nella quale si è messo in precedenza un po' di gelatina glicerinata fusa, e vi si lasciano stare a dolce calore per un'ora. Poscia si versa la gelatina con la crusca in una doccia o in un canale a fondo cieco, praticato in un midollo di sambuco; si lascia raffreddare e rapprendere la gelatina e poi si pone il midollo di sambuco nell'alcool a 85°-90°, che di regola, dalla sera al mattino, mette in grado di poter eseguire le sezioni o a mano o col microtomo. Le sezioni poste sul vetro portoggetti si riscaldano lievemente in modo da fondere la gelatina e da permettere di togliere il cercine di sambuco che sta tutt'attorno, si ricoprono con una goccia di gelatina glicerinata fusa che si copre col vetrino coproggetti e così sono pronte per l'esame, il quale va fatto all'ingrandimento di 40-50 diametri.

Parti della crusca. — Sezionando trasversalmente la crusca è possibile distinguere in essa una serie di strati comuni a tutti i semi che, seguendo i dettami della botanica, sono i seguenti: il *pericarpo* o *perisperma* (che costituisce le pareti del seme), distinto in tre strati: epicarpo, mesocarpo, endocarpo; lo *spermoderma*, distinto, come sempre, in due strati: testa ed endopleura o tegmen; lo *strato delle cellule aleuroniche.*

Ora, gli strati suesposti, nelle crusche delle diverse cariossidi, presentano delle diversità che rendono possibile di poter stabilire a quale vegetale appartenga la crusca in esame.

Senza entrare in particolari e attenendoci ai soli caratteri differenziali che presenta ciascuna crusca, ecco quanto è strettamente necessario per poter stabilire a qual seme appartenga la crusca presa in esame.

Crusca del frumento (fig. 217). — L'epicarpo è caratterizzato da vari strati di cellule allungate a pareti spesse, giallo-brune.

Il mesocarpo consta delle così dette cellule di cintura, grandi 154-192 μ, giallicce, splendenti, punteggiate, diritte o incurvate alquanto nel senso del diametro minore della cariosside. Esse sono comunemente ritenute caratteristiche dell'endocarpo, e allora il mesocarpo risulterebbe di vari strati di grandi cellule punteggiate, costituenti un tessuto facil-

mente lacerabile, sottostante all'epicarpo. Però questa distinzione degli strati del pericarpo, non è secondo quella data dai botanici (Strassburger). L'endocarpo sarebbe invece caratterizzato dalla presenza di qualche cellula otricolariforme e a seme adulto sarebbe poco o niente visibile.

Lo spermoderma ordinariamente si distingue in due strati: l'esterno bruno, e l'interno ialino; però, realmente, esso consta di tre: l'uno formato da una membrana sottile, scolorata, di aspetto omogeneo, l'altro di una membrana sottile, bruna, formata da cellule le cui pareti laterali non sono bene distinguibili e il terzo di una membrana bianca molto rifrangente.

Lo strato delle cellule aleuroniche spesso 50-55 μ è costituito da cellule poligonali di fronte, rettangolari di lato.

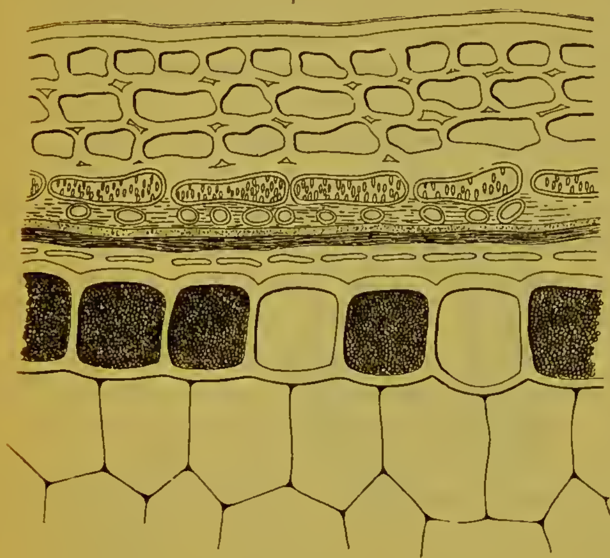


Fig. 217.

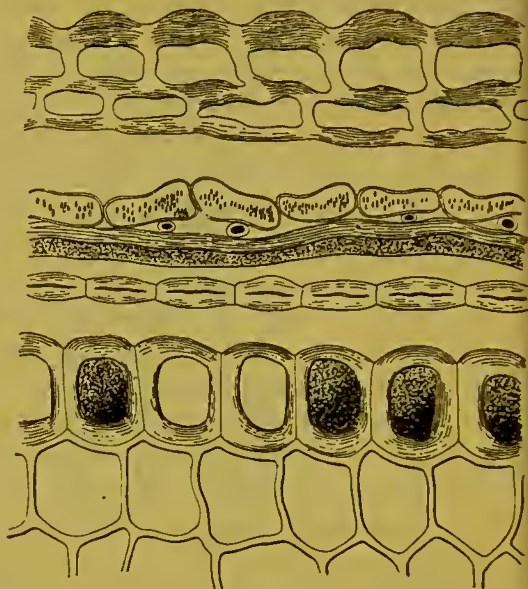


Fig. 218.

Crusca della segala (fig. 218). — La struttura degli strati della crusca della segala è pressochè simile a quella del frumento: ne differisce però essenzialmente perchè lo *strato delle cellule di cintura* è formato da cellule allungate che si presentano verso l'esterno, mentre quelle del frumento, se si presentano incurvate, lo sono verso l'interno.

Dippiù lo spessore della crusca è almeno di un quinto inferiore a quello del frumento: difatti quella del frumento misura μ 110-120, mentre quella della segala misura μ 95-100 in media. (Di Vestea).

Notisi che nella fig. 218 gli strati appaiono distanti a causa della macerazione del preparato.

Crusca dell'orzo (fig. 219). — La struttura degli strati della crusca dell'orzo diversifica da quella del frumento per la presenza sul pericarpo dei residui delle glume, cioè di protuberanze coniche per l'impianto dei peli, nonchè per la presenza di un triplice strato di cellule aleuroniche,

mentre nel frumento e nella segala questo strato è costituito da un solo filare di cellule.

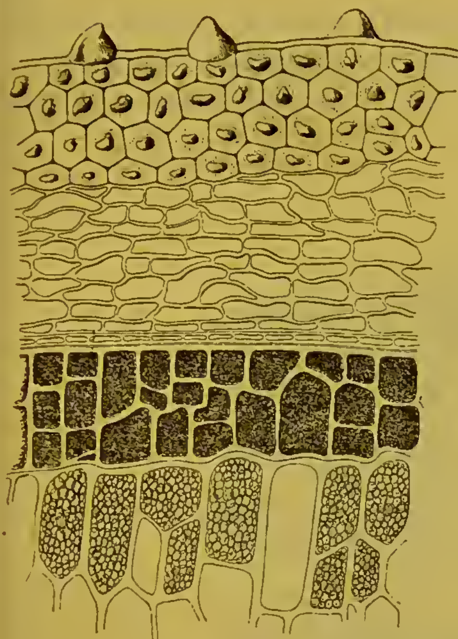


Fig. 219

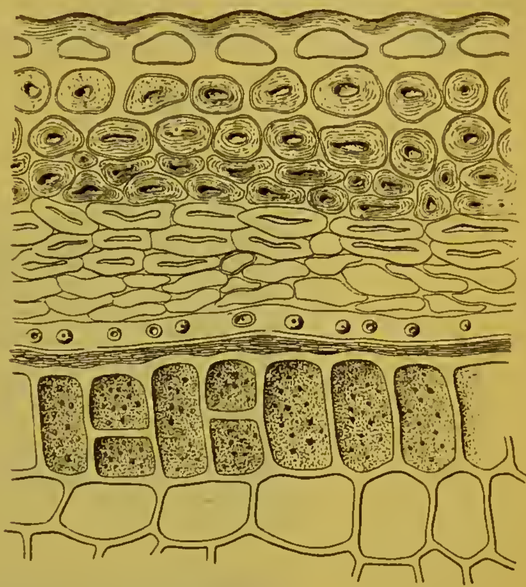


Fig. 220.

Crusca del mais (fig. 220). — È specialmente caratteristica perchè il pericarpo è rivestito di uno strato ondulato per la presenza di cellule a parete spessissima a lume largo, sotto le quali trovansi delle cellule fusiformi a lume stretto. In quanto allo strato spermodermico, è pochissimo sviluppato e non presenta niente di caratteristico. Lo strato delle cellule aleuroniche generalmente è unico, ma può mostrarsi anche doppio.

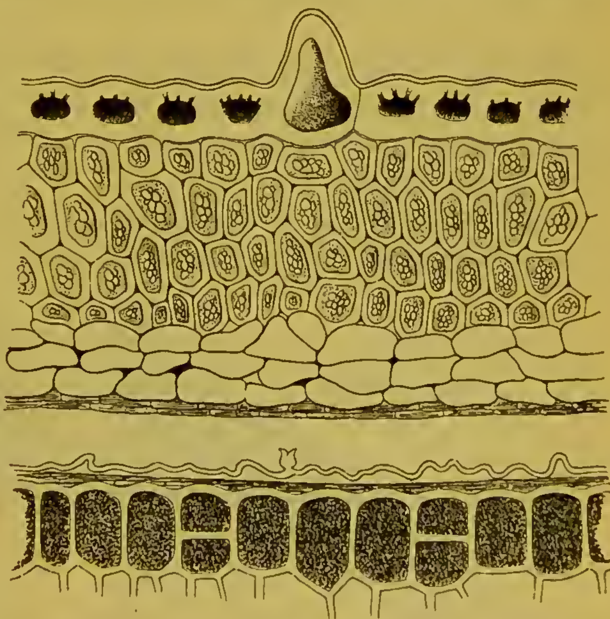


Fig. 221.

Crusca dell'avena (fig. 221). — È caratterizzata dal perchè ad essa stanno adesi frammenti delle glume del seme, costituiti da uno strato esterno di cellule a pareti spesse, ondulate, incastrate le une nelle altre, sul quale si trovano o cerchietti che rappresentano i punti ove erano impiantati i peli o i peli stessi, essendo questi distribuiti su tutta la superficie nel seme. Seguono poi vari strati di cellule fusiformi, un parenchima a pareti sottili nel quale si può trovare clorofilla. Lo spermoderma è sottile e bruno, lo strato

delle cellule aleuroniche è unico. Lo spessore della crusca è di 50 μ in media. (Di Vestea).

Crusca del riso (fig. 222). — È caratterizzata per lo più dal solo strato spermodermico, costituito di cellule rettangolari o irregolari o allungate a pareti sottili e dello strato ialino. Quando si trovano anche



Fig. 222.

le glume del seme, queste sono formate sia da uno strato di cellule a parete molto spessa, irregolarmente cubiche, a lume grande con insenature, fra le quali cellule stanno incastrati i peli, sia da cellule fusiformi in vari strati.

Crusca del grano saraceno (fig. 223). — È caratterizzata dalla presenza, procedendo dallo esterno all'interno, di uno strato di cellule a

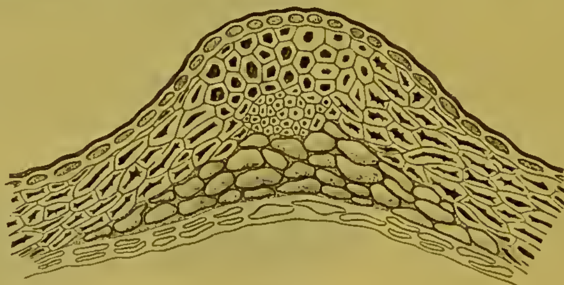


Fig. 223.

parete spessa e a lume grande come nel mais, di varî strati di cellule fusiformi a lume stretto ed a parete spessa, di varî strati di cellule grandi a pareti sottili che si trovano negli angoli del seme e che costituiscono

quello che comunemente chiamasi parenchima: in questo tessuto si nota la presenza di fasci vascolari a spirale. Segue lo spermoderma, formato da cellule rettangolari, sottili, costituenti una membranella.

Crusca della dura (fig. 224). — L'epicarpo è rappresentato da una cuticola sottile e priva di organizzazione percettibile. Il mesocarpo è

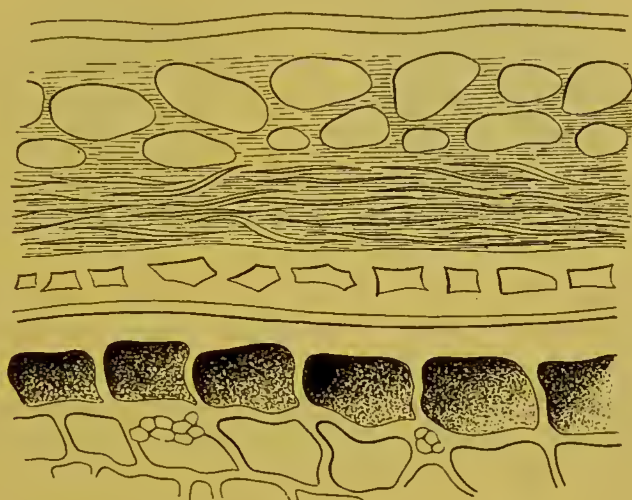


Fig. 224.

formato da due filoni sovrapposti di cellule a grosse pareti allungate nel senso della direzione della lunghezza del seme: hanno foıma tubulare, contorni ondulati, e sono ricche di pori disposti generalmente lungo la linea mediana del loro asse maggiore.

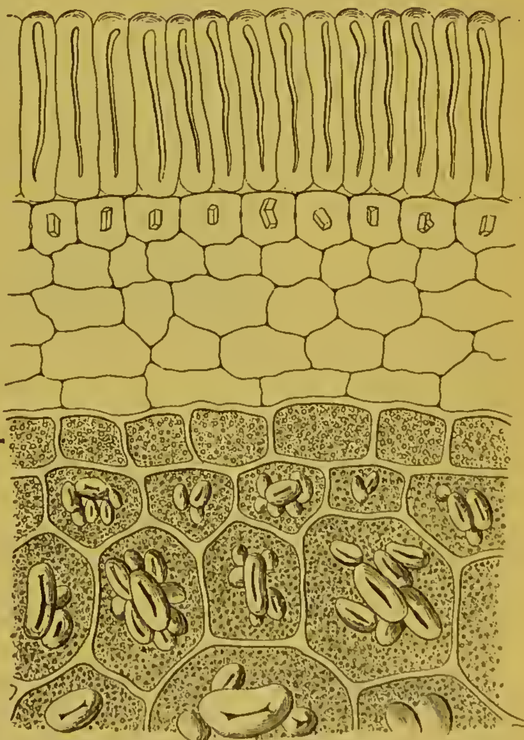


Fig. 225.

L'endocarpo è formato da cellule di spessore variabile a contorni non ben definiti: in sezione longitudinale si riconoscono però per fibre. Lo spermoderma consta di quattro strati, due di cellule tubulari lunghe e sottili, due rappresentati da due sottili membrane probabilmente corrispondenti allo strato ialino e bruno della crusca del frumento. (Tortelli).

Crusca delle leguminose (fig. 225). — La crusca delle leguminose presenta un primo strato di cellule molto allungate, disposte nel senso dell'asse minore del seme o *strato delle cellule a palizzata;* un secondo *strato delle cellule così dette prisma-*

tiche perchè formate da cellule allungate di forma prismatica addossate le une alle altre e contenenti cristalli di ossalato di calcio; un terzo *strato delle così dette cellule stellate* perchè formato di cellule irregolari o raggiate con spazi fra di loro; lo strato spermodermico formato da un filare di cellule irregolarmente quadrangolari punteggiate o *strato parenchimatoso* e uno strato di cellule rettangolari o *epidermide inferiore.*

Di guisa che, riunendo assieme i principali caratteri testè esposti per le varie specie di crusche, ne risultano i seguenti criterî, dei quali il microscopista può e deve giovarsi ogni volta che gli occorra di fare una diagnosi di farine, cioè:

1° *la crusca del frumento* ha di caratteristico la presenza di uno strato di cellule di cintura allungate dritte o leggermente curve verso l'interno;

2° *la crusca della segala* ha di caratteristico la presenza di uno strato simile, ma con le cellule a semiluna presentanti la loro curvatura rivolta all'esterno;

3° *la crusca dell'orzo* ha di caratteristico specialmente la presenza di un triplice strato di cellule aleuroniche e la eventuale presenza della gluma;

4° *la crusca del mais* ha di caratteristico la presenza sul perisperma di una cuticola a superficie ondulata formata da un primo strato di cellule a parete molto spessa e a lume largo;

5° *la crusca della dura* ha di caratteristico le cellule ricche di pori lungo la loro linea mediana, e lo spermoderma composto di quattro strati;

6° *la crusca del grano saraceno* ha di caratteristico i molti strati delle cellule dell'epicarpo, varie per forma e dimensione;

7° *la crusca dell'avena* ha di caratteristico la presenza di un primo strato di cellule incastrate le une nelle altre con dei cerchietti fra di loro rappresentanti i punti di inserzione dei peli o coi peli stessi ivi impiantati;

8° *la crusca del riso* ha di caratteristico, quando si trovano i resti delle glume, la presenza di un primo strato di cellule irregolarmente cubiche a pareti spesse e lume sfrangiato fra le quali sono incastrati i peli;

9° *la crusca delle leguminose* presenta di caratteristico lo strato delle cellule a palizzata, oltre poi allo strato delle cellule prismatiche con cristalli di ossalato di calcio, ecc.

Naturalmente nelle farine possono trovarsi altri frustoli non appartenenti alle crusche che sopra abbiamo descritte.

Così, per esempio, potranno trovarsi *frammenti di buccia di patate*, dei quali si parla a pag. 881, o i frammenti della *buccia delle castagne* e propriamente dell'endopleura o buccia interna. Questi frammenti, esaminati al microscopio, si presentano formati da cellule pentagonali o esagonali, brune, irregolari e riunite da prolungamenti nella castagna amara (*Aesculus hyp-*

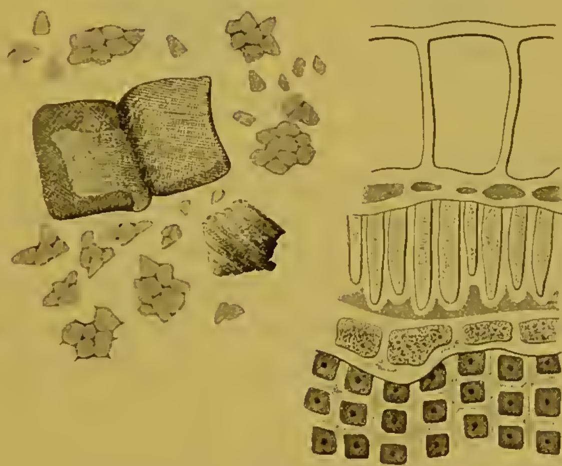
pocastanus, fig. 226, *a*) saldate insieme nella castagna mangereccia (*Castanea vesca*, fig. 226, *b*).

Finalmente, specie nelle farine che servono di alimento agli animali, si possono anche trovare dei corpuscoli angolosi, vitrei, rosso-cupi, i quali



Fig. 226.

sezionati presentano un primo strato formato da grandi cellule quadrangolari a pareti sottili, un secondo strato di cellule irregolari poco distinte, con uno strato di cellule allungate e poi uno strato di cellule poligonali, quadrangolari, contenenti una sostanza bruna, ecc. (fig. 227); questa struttura è propria del *Linum usitatissimum*.


Fig. 227.

II. Esame per riconoscere se in una farina esistano elementi appartenenti a semi nocivi. — Quando il grano non è stato bene vagliato ovvero quando è stata commessa una frode, si può trovare nella farina traccia dei così detti *semi eterogenei*, di cui alcuni sono realmente dannosi alla salute perchè causa di disturbi nervosi e gastro-enterici.

I semi eterogenei che più comunemente si trovano mescolati alle farine sono:

il lolio (*Lolium temulentum*); il niello (*Agrostemma githago*); il melampiro (*Melampyrus pratense* s. *arvense*); il latiro (*Lathyrus aphaca* et

climenus); la veccia (*Vicia sativa*); la saggina (*Sorghum vulgare*); il delfinio (*Delphinium consolida*); il rafano selvatico (*Raphanus raphranistrum*); il rinanto (*Rinantus maior* et *minor*); l'atreplice (*Atreplix astata*).

La ricerca di questi semi si fa, sia col semplice esame microscopico della farina, sia con ricerche microchimiche.

Esame microscopico. 1° Data la presenza di *lolio*, si noteranno i così detti corpuscoli del lolio, ossia dei corpi grandi 20-50 μ, rotondi o reniformi, formati da un mosaico di granuli poliedrici addossati gli uni agli altri, ciascuno grande 3 μ in media (fig. 228), nonchè frustoli di crusca che

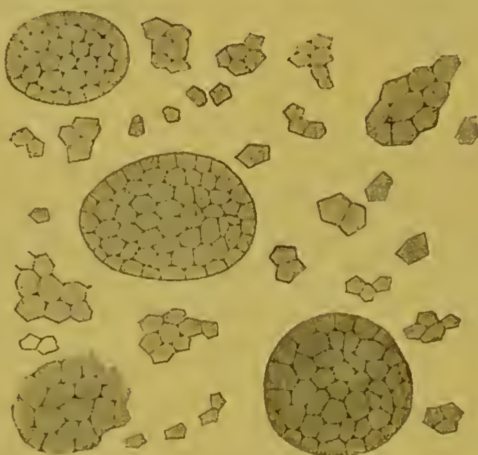


Fig. 228.

hanno molta rassomiglianza con quelli del frumento, ma che se ne distinguono per alcune particolarità, come per il colorito giallo-verdastro a riflessi violacei del pericarpio, per lo spessore di 70 μ, ecc. In pratica del resto può togliere ogni dubbio il trovare, dopo trattamento dei frustoli con potassa al 10 %, fra lo spermoderma e lo strato delle cellule aleuroniche, il micelio di un fungo, che non si trova mai nella crusca del frumento.

A questo fungo si è attribuita molta importanza poichè alcuni credono che l'azione tossica (che si esplica con la produzione di vertigini) che produrrebbe il lolio, e quindi la produzione della sostanza tossica detta temulina, sia dovuta al fungo stesso. Il fatto che tra le graminacee in condizioni ordinarie, solo il *Lolium temulentum* ha quest'azione, e che altre graminacee, come la segale, producono vertigini solo quando la loro cariosside è invasa da un micelio analogo, confermerebbe questa ipotesi e indurrebbe a sospettare che si tratti di un unico parassita, che secondo il Ludwig sarebbe la *Ciboria temulenta* s. *strumantina*.

2° Data la presenza di *niello* o *gittaione*, si noteranno i così detti corpuscoli amidacei dell'agrostemma (fig. 229, *a*), ossia dei corpi allungati, cuneiformi, finamente punteggiati per la presenza di finissimi granuli di amido, i quali si disgregano quando i corpi amidacei vengono

trattati con l'acqua e si vedono muoversi nel liquido con movimento browniano, nonchè per quella di frustoli di crusca, che, sezionati, mostrano alla periferia delle protuberanze, le così dette villosità dell'agrostemma, pressochè coniche, rappresentanti, in sezione, gli aculei che trovansi sulla superficie del seme (fig. 229, *b*).



Fig. 229.

Quando si sospetti che una farina contenga dell'agrostemma non solo è necessario dimostrare la presenza, ma anche la quantità di esso, poichè le farine infettate si giudicano insalubri al limite di 0.50%.

Si può ricorrere al procedimento del Di Vestea. Questi consiglia, perciò, distendere la farina col metodo Pratesi e di raccogliere pazientemente, dopo spruzzatura col liquido del Vogl, i punti neri reperibili in 5-6 quadratini di 4 cm. di lato, servendosi di apposito cartoncino portante appunto una perdita di sostanza di 16 cmq. Egli ha veduto che una farina niellata al 0.50% lascia pescare, sopra una superficie di 16 cmq. in media, 5 frammentini di perisperma, chiaramente identificabili, ed ha concluso col dire che va giudicata la farina insalubre o nociva quando trovansi di quegli elementi, in ogni campo di 16 cmq. in numero non minore di 2-3.

Recentemente il Rusconi ha indicato anche il seguente metodo emolitico. « 5 gr. di farina vanno posti iu una capsuletta a fondo piano di circa 8 cm. di diametro sopra una garza fitta ed in doppio strato, quadrata, avente 10 cm. di lato. Da una buretta graduata, si lasciano cadere goccia a goccia e molto lentamente 4 cmc. di soluzione acquosa di citrato neutro di sodio al 2 %, rimescolando delicatamente con bacchetta di vetro ed in modo da formare una pasta omogenea che non si attacchi alla garza. Si costringe al centro il materiale, raccogliendolo agli angoli, col premere dal di fuori la garza colle dita. Ottenuta la pasta, si chiude l'involto, si adunano i capi e si attorcigliano. Si torna ad impastare un poco in modo che il bolo risulti omogeneo, poi a goccia a goccia e mantrugiando di continuo, si fanno cadere sulla superficie esterna della garza, altri 16 cmc. di soluzione di citrato, raccogliendo accuratamente nella capsuletta il liquido amidaceo che scola man mano. Si spreme il glutine con garbo, pur mantenendolo nell'involto. Si agita il liquido amidaceo, si filtra per filtro bagnato

previamente con soluzione di citrato, si rifiltra se occorre, cosicchè il liquido acquoso risulti limpido, e se ne prelevano 2-3 cmc. in una provetta. A questi si aggiunge una goccia di globuli sanguigni sedimentati » (lavati tre volte in *NaCl* al 0.85 % e ogni volta centrifugati). « Si pone in termostato per tre ore e si fa l'osservazione dopo 10 ore di riposo in luogo fresco ».

Le farine normali di frumento non dànno estratti emolitici; quella di agrostemma nella proporzione di 0.1 % cmc. di soluzione di citrato, dà emolisi completa dopo 1 ora, le farine di frumento con agrostemma dànno estratti emolitici al limite del 0.5% di agrostemma, quelle di segala con agrostemma dànno estratti emolitici intorno al limite 1 %.

Oltre a tutte le varietà di agrostemma anche l'atreplice ed il delfinio impartiscono proprietà emolitiche agli estratti delle farine, però questi semi alterano anche le proprietà organolettiche delle farine, ciò che non fa l'agrostemma.

3° Data la presenza di *melampiro* (fig. 230), si noteranno frustoli di crusca: questi, sezionati, devono presentarsi formati da uno strato cuticolare giallo-bruno, con al disotto cellule poligonali a grosse pareti e poi un reticolo cotiledonare rosso-bruno a maglie poliedriche coi sepimenti formati da cellule ialine, quadrangolari, disposte simmetricamente, contenenti una sostanza protoplasmatica grigia e delle goccioline di olio.

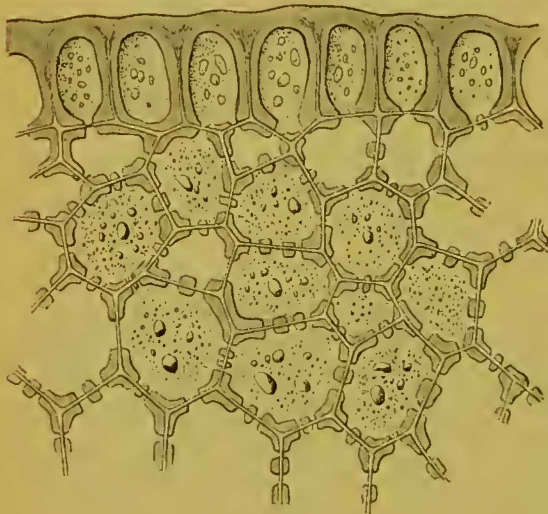


Fig. 230.

4° Data la presenza di *latiro* o di *veccia*, si noteranno nella farina granuli di leguminose e frammenti di crusca con le note caratteristiche di quella delle leguminose. Per giungere alla diagnosi di latiro o di veccia gioverà però ricordare:

a) per il *latiro*: che il pericarpo presenta delle macchie nere, marmorizzate o variegate di rosso e nero su fondo sporco, macchie che al microscopio presentansi violette; che lo spessore dello strato delle cellule a palizzata è di 60-63 μ; che quello delle cellule prismatiche è di 47 μ; che lo spessore dello spermoderma è di 15 μ; che lo spessore della crusca è di 180 μ; che la grandezza dei granuli è di circa 25 μ e di circa 40 μ, senza grandezze intermedie, e che il reticolo amilifero presentasi a maglie pentagonali, grandi 50 μ, resistente alla potassa al 10 % e racchiudente i granuli avvolti in una massa granulosa, colorabile in giallo coll'iodio;

b) per la *veccia*: che il pericarpio ha colorito marrone scuro con macchie nere; che è rivestito allo esterno di una cuticola delicatissima; che lo spessore delle cellule a palizzata è di 55-60 μ; che quello delle

cellule prismatiche è di 25-30 μ; che quello dello spermoderma è di 20-25 μ; che quello della crusca è di 100 μ; che la grandezza dei granuli è di 28-30 μ; ossia intermedia tra i granuli piccoli e i grandi del latiro, e che il reticolo amilifero è a maglie esagonali più lunghe di quelle del latiro, cioè 80-95 μ.

5° Infine la presenza di *saggina*, di *delfinio*, di *rafano selvatico*, di *rinanto* e di *atreplice* si può anzitutto agevolmente supporla, perchè le farine in tali casi sono alterate nei loro caratteri organolettici. Per es., l'*atreplice*, che nei tempi di carestia in Russia si suole aggiungere alla farina di grano, si riconosce, anche senza alcun aiuto del microscopio, dal colorito grigio e persino nero, che impartisce al pane (il così detto pane della fame). Questi semi, almeno sinora, non sembrano produrre alcun disturbo all'organismo, salvo il *delfinio*, il quale, oltre a dare alle farine sapore acre e disgustoso, è dimostrato essere nocivo. La diagnosi di essi si fonda essenzialmente sui caratteri della crusca ed è resa più alla mano dalle ricerche microchimiche.

La crusca del *delfinio* è costituita da un perisperma rivestito di aculei ed ha la stessa costituzione di quella del grano saraceno· l'ovario è costituito da un reticolo a maglie esagonali con goccioline di olio senza amido. (Terni).

La crusca del *rafano* presenta un perisperma giallo-oro, formato da una pellicola rugosa, da uno strato di grandi cellule pavimentose pentagonali e poi da una membrana crivellata di fori, sotto cui trasparisce lo strato delle cellule pigmentate. L'albume è giallo-zolfo a maglie ovoidali e poligonali contenenti zone di sostanze oleose prive di amido

La crusca del *rinanto* ha il perisperma con la parte esterna costituita da uno strato di cellule allungate e sottili, e subito sotto vi è l'albume a maglie quadrangolari a contenuto granuloso, senza amido. (Terni).

Esame microchimico. — Per procedere a questo esame usasi il reattivo del Vogl (alcool a 70° p. 100 e acido cloridrico p. 5), nonchè la potassa al 10 % e l'acido solforico al 10 % sempre in alcool a 70°. (Terni).

Procedimento col reattivo del Vogl. — Seguendo il metodo Pratesi Di Vestea « sopra di un comune piatto bianco a superficie levigata, si distende una piccola quantità di farina (5-10 gr.) in strato sottile, aiutandosi con lo spigolo di un cartoncino a renderlo, quanto è più possibile, uniforme. Quindi la si asperge con il liquido di Vogl, che riesce comodo di tenere in uno spruzzino di vetro, il cui turacciolo sia attraversato da un solo cannello di vetro tirato a sottile pipetta, avendo cura di bagnare lo strato di farina in maniera uniforme. Ciò fatto, si riscalda il piatto al disopra di una fiamma, sino alla prima comparsa di vapori e si aspetta alquanto per veder comparire qua e là delle piccole aree di colorazione, ovvero il mettersi in evidenza e moltiplicarsi a vista dei punticini nerastri ».

La comparsa dei *punti nerastri* guida alla ricerca del *niello*, *delfinio*, *veccia*, *acari*; la comparsa di chiazze, colorate generalmente in *rosso* o

violetto o *azzurro*, fanno dubitare della presenza della *segala cornuta, lolio, latiro, saggina, dura, faggiuolo, melampiro*, ecc.

Tutti questi diversi elementi si raccolgono sulla punta di un ago per farne l'esame microscopico e si osservano in una goccia di acqua o di glicerina al 50 %. comprimendo leggermente il coproggetti, a piccolo ingrandimento (acari, villosità dell'agrostemma) e, se occorre, a forte (segala cornuta).

Va qui notato che originariamente la ricerca dei semi eterogenei si praticava seguendo il metodo del Vogl e più tardi quello del Pratesi. Vogl trattava 2 gr. di farina con 10 cmc. del suo reattivo e se otteneva una colorazione giallo-aranciata del liquido che si separava dal deposito della farina, lasciando in riposo la provetta, affermava che nella farina trovavasi del *gittaione*, mentre se otteneva una colorazione rosea, che si modificava in verde con l'aggiunta di alcali, affermava che vi si trovava del *lolio*. Il reattivo del Vogl usato in tale modo riesce, però a scoprire il *gittaione* solo quando trovasi mescolato alla farina almeno nella proporzione del 5 % e il *lolio* almeno in quella dell'8 % Pratesi consigliò di distendere la farina in sottile strato sopra un piatto di porcellana, di bagnarla col reattivo del Vogl e di osservare se si notava la presenza di punti rosei i quali starebbero a indicare la presenza di frustoli di lolio, ecc.

Procedimento con la potassa al 10 % *e l'acido solforico al* 10 %. — Anzitutto si possono, distesa la farina secondo il metodo Pratesi, spruzzare due preparazioni, l'una col liquido di Vogl, in cui all'acido viene sostituita la potassa al 10 %, e l'altra con lo stesso reattivo, sostituendo all'HCl, l'H_2SO_4. Così, secondo il Terni, si mettono subito in evidenza quali elementi reagiscono alla potassa o all'acido o ad ambidue i reattivi, e quali rimangono inalterati nelle loro tinte. Si possono anche raccogliere dei frustoli di crusca, e postili sopra un portoggetti, in una goccia d'acqua distillata, si coprono con un coproggetti.

Quindi si pone ad un lato del vetrino coproggetti un pezzetto di carta bibula e dall'altro una goccia della soluzione di potassa o di acido solforico, in modo da sostituire questi reattivi all'acqua distillata e si osserva a debole ingrandimento.

Il Terni ha così notato che in generale con gli alcali i pigmenti reagiscono con una gradazione di tinte dal giallo-verdastro al verde sino all'azzurro intenso e con gli acidi dal rosa pallido sino al rosso scarlatto e al rosso mattone, e ha potuto stabilire il quadro seguente, nel quale trovansi indicate le colorazioni assunte dal perisperma dei più diversi semi dopo il trattamento microchimico.

Però, per quanto consta dalla mia esperienza, non bisogna credere che le colorazioni indicate dal Terni per i pericarpi dei vari semi siano in tutti i casi assolutamente specifiche si dà affermare che un dato frustolo appartenga certamente ad un seme piuttosto che ad un altro, perchè in alcuni casi non le ho trovate corrispondenti a quelle indicate nella tabella: per conto mio sono d'avviso che queste ricerche necessitino di ulteriori e più numerosi controlli.

TABELLA 89.

Semi	Colore normale del perisperma	Potassa 10 %	Acido solforico 10 %
Frumento	giallo paglierino . . .	giallo; leggera colorazione verdastra delle cellule di cintura	giallo; leggera colorazione rosea delle cellule di cintura.
Orzo	id.	id.	id.
Segala.	id. più colorato lo strato delle cellule di cintura	giallo verdastro; colorazione verde chiara delle cellule di cintura	giallo non pallido; più colorite le cellule di cintura.
Avena.	giallo paglierino . . .	verde chiaro più intenso nell'endocarpo; distinta colorazione dei peli e della cuticola del pericarpo	giallo rosa pallido.
Mais (giallo e rosso)	giallo.	giallo verdastro; il reattivo estrae il colore anche dall'amido	nessuna reazione.
Mais (bianco) . .	giallo pallido	giallo verdastro; nessuna reazione dell'amido	nessuna reazione.
Riso	incoloro o leggermente colorato in alcuni punti in marrone	nessuna reazione o leggermente verde chiaro	nessuna reazione.
Grano saraceno .	giallo scuro.	giallo verde chiaro	giallo chiaro.
Dura	giallo-rosso cinabro. .	inalterato; si colorano in verde lo spermoderma, le cellule aleuroniche e l'embrione; il reattivo estrae il color verde	inalterato
Panico	giallo verdastro. . . .	verde chiaro	giallo rosa.
Miglio.	giallo.	giallo	giallo rossastro.
Lolio	giallo verdastro. . . .	verde chiaro, verde erba persistente	rosa e rosso ciliegia e rosso fucsina persistente.

Segue TABELLA 89.

Semi	Colore normale del perisperma	Potassa 10 %	Acido solforico 10 %
Agrostemma. . .	bruno marrone	nessuna reazione; il reattivo colora l'amido in giallo verdastro e ne estrae il colore	nessuna reazione: accentua leggermente il colore marrone.
Delfinio	nero (assenza di amido - colorazione gialla delle bolle di olio con tintura di jodio)	nessuna reazione	nessuna reazione.
Rafano selvatico.	giallo d'oro (assenza di amido)	giallo rossastro	giallo con riflessi verdastri.
Rinanto	grigiastro (colorazione gialla con tintura di jodio)	giallo aranciato.	nessuna reazione
Melampiro. . . .	giallo chiaro	nessuna reazione	id.
Latiro.	grigio a macchie violacee e nere	azzurro intenso e verde mare (fugace)	rosso vinoso e rosso violetto persistente.
Veccia	marrone con macchie nere	marrone e giallo; macchie viola scuro	nessuna reazione.
Sorgo	rosso marrone.	rosso giallastro; il reattivo estrae il colore senza alterarne la tinta; colora in verde pallido lo spermoderma e le cellule a glutine	colorito rosso più brillante.
Atreplice	marrone	nessuna reazione	rosso bruno.
Fagiuolo	variabile	verde chiaro che si converte in azzurro	rosso carminio che si converte in marrone.
Segala cornuta. .	. . . .	violetto persistente	nessuna reazione

III. Esame per riconoscere se ad una farina siano mescolate farine inferiori, fecole, segatura di legno, polveri minerali. — 1. *Mescolanza con farine inferiori.* — Le diverse operazioni per giungere alla diagnosi sono le seguenti:

1° Esame microscopico dell'amido prelevandolo dal sedimento formatosi in un bicchiere a calice pieno d'acqua nel quale si sono gettati pizzichi della farina in esame.

2° Esame microscopico, previa separazione meccanica degli amidi, la quale si fa mediante quell'operazione che dicesi *levigamento dell'amido.*

A tal uopo si impastano 10 gr. della farina sospetta, si pongono entro una pezzuola i cui capi si legano mediante un filo, e poi si pone il sacchetto sotto uno stillicidio d'acqua, premendolo con le dita. Si raccoglie contemporaneamente il liquido in un sottostante bicchiere a calice, fino a 50-80 cmc. Si agita e si versa il liquido in un secondo bicchiere: si lascia riposare il liquido fino a che sia fatto un po' di deposito, poi si decanta in un terzo bicchiere e, formatosi un deposito, si decanta in un quarto e, ove sia necessario, si ripete l'operazione in un quinto. Così si riescono a separare i granuli di amido di differente peso, cioè i più pesanti nel primo bicchiere, i meno nel secondo e così di seguito, ciò che sino ad un certo punto vuol dire separare i più grandi dai più piccoli.

3° Esame microscopico del reticolo cotiledonare e quindi raccolta delle massette che rimangono nel setaccio dopo la *stacciatura della farina*; trattamento delle medesime con potassa all'1 % e osservazione successiva in glicerina diluita.

4° Esame dei frustoli che rimangono a galla in un bicchiere pieno di acqua, nel quale siasi versata della farina, per vedere se fra essi si trovano dei peli.

5° Distensione della farina in sottile strato, sopra un foglio di carta o piatto bianco verniciato, ricerca dei frustoli di crusca, inclusione di essi in gelatina glicerinata, sezionamento e osservazione.

6° Distensione come sopra, e prova microchimica colla potassa e coll'acido solforico, ricorrendo alle tavole del Terni per i risultati, senza però attribuire assoluta specificità alla colorazione ottenuta.

I casi speciali, che più facilmente si presentano, sono la mescolanza della farina di *mais bianco*, di *leguminose*, di *segala*, di *orzo*, di *grano saraceno*, di *dura*, di *avena*, di *riso* alla farina di frumento.

Procedimenti per riconoscere la farina di mais aggiunta a quella di frumento.

Lo Sclavo ha messo a profitto l'esame polariscopico. Egli ha anzitutto rilevato che non tutti i corpuscoli dell'amido di mais bianco sono attivi alla luce polarizzata e precisamente i globosi grandi e i globosi e poliedrici piccolissimi, mentre quelli di media grandezza (15-20 μ), mostrano sempre, in campo oscuro, una croce nera spiccatissima con le branche disposte l'una

normalmente all'altra. Ciò premesso, egli ha notato che di fronte al frumento questa proprietà è molto più spiccata; in altri termini, è ben vero che le forme di media grandezza di quest'ultimo mostrano più netta in campo oscuro la croce nera; ma non mai così spiccata come quelle dei granuli del mais. Dippiù, nei primi, le branche della croce di solito si presenterebbero inclinate l'una sull'altra formando in alcune un vero X: solo qualche volta sarebbero disposte in posizione verticale come nel mais.

Il Baumann invece tratta i preparati di farina con potassa all'1.8 per cento, la quale, in questa concentrazione, distrugge i corpuscoli di frumento lasciando quelli di mais.

Però, tanto il metodo dello Sclavo, quanto quello del Baumann e i consimili, non servono a ricercare i granuli di mais quando si trovano in piccola quantità nella farina di frumento.

Casagrandi e Clavenzani si servono di un procedimento col quale hanno cercato:

1° mettere in evidenza la presenza anche di pochi granuli di mais in grandi quantità di farine, eliminando, prima di fare preparati microscopici, dalle farine medesime, i corpuscoli di amido di frumento, segala, orzo;

2° riunire in un solo procedimento tutti gli elementi necessari per una diagnosi sicura, in modo da non dover ricorrere a ricerche comparative.

All'uopo bisogna operare su grande quantità di farina in modo da poter trovare più facilmente i granuli di mais che vi potessero essere frammisti.

Si prendono quindi da 30 a 50 gr. del campione di farina, in cui si sospetta la presenza dell'amido di mais, si impastano con acqua e si pongono in una pezzuola che viene sottoposta ad uno stillicidio d'acqua, come si fa per levigare l'amido. Però, a differenza dell'ordinario modo di procedere, non si sospende l'operazione allorchè si sono raccolti da 80 a 100 cmc. di liquido in un bicchiere a calice, si prosegue invece sino ad ottenere una quantità tripla-quintupla di liquido. Si lascia riposare il materiale in bicchiere a calice per varie ore, favorendo, ove si creda opportuno, la deposizione dei granuli di amido mediante la centrifugazione; indi si decanta il liquido.

Al deposito così ottenuto viene aggiunta una certa quantità di uno degli acidi minerali cloridrico, nitrico, solforico nelle proporzioni stabilite (v. pagina 848) per distruggere i granuli di frumento, ma non quelli di mais. Esso si lascia agire per pochi minuti (in genere è consigliabile di non raggiungere i 5') e si arresta la sua azione coll'aggiunta di abbondante acqua distillata.

Dopo aver lasciato riposare il materiale in bicchiere a calice almeno per mezz'ora, si decanta e si osserva il deposito che si raccoglie con una pipetta. Sotto al campo del microscopio, se l'operazione è riuscita, debbono osservarsi i granuli di frumento, orzo e segala, pallidi, molto rigonfiati, senza alcuna rifrangenza, con un aspetto cioè analogo a quello delle emazie scolorate, donde il nome di *ombre di granuli* che abbiamo proposto di dare ai corpuscoli di amido che si trovano in tali condizioni.

In mezzo a queste ombre si noteranno gli aggruppamenti dei corpuscoli amilacei del mais, che hanno l'aspetto caratteristico a pavimento e che sono formati in gran parte dai grossi granuli del mais alquanto rigonfi e deformati (specialmente quelli periferici). I medî ed i piccoli granuli di mais inal-

terati, o tutt'al più coll'ilo reso maggiormente evidente, spiccheranno evidenti per la loro forma e per la loro rifrangenza.

Un tale reperto è certamente sufficiente per riconoscere il mais nella farina di frumento; solo qualora non fosse possibile rinvenire i granuli medî di mais, ma si notassero soltanto gli accumuli a pavimento dei granuli grandi, si può avvalorare la diagnosi coll'esame polariscopico, come consiglia lo Sclavo.

In ogni caso, qualora non sia possibile applicare il metodo polariscopico perchè gli ammassi sono troppo alterati, noi consigliamo di aggiungere, sotto al campo del microscopio, una soluzione diluita di uno dei colori di anilina che colorano solo o preferibilmente i granuli di mais.

Così, adoperando, per esempio, la soluzione acquosa satura di rosso di Magdala, si noterà che i granuli di mais assumono un colorito rossastro che tende al violetto, mentre invece le ombre dei granuli rimangono tinte in rosa un po' carico. In genere, specialmente negli ammassi dei granuli, sono i contorni dei granuli stessi che appaiono più colorati.

Qualora poi l'amido di mais sia aggiunto alla farina di frumento in quantità notevole, questo metodo diventa della più grande semplicità, perchè rende possibile la diagnosi del mais anche senza microscopio.

A tal uopo, dopo aver trattato cogli acidi il deposito ottenuto col levigamento dell'amido, si aggiunge addirittura nel bicchiere a calice la soluzione colorante (che è meglio sia di colori, che anche in soluzioni acquose sature la lasciano trasparente per esempio, di rosso di Magdala, di giallo-acido) lasciandola agire circa mezz'ora, ed agitando ogni tanto. Trascorso questo tempo, si lascia riposare il materiale, si decanta il liquido, si aggiunge acqua e si osserva se nel deposito si sono formati dei piccoli grumi colorati. Data l'esistenza di questi ultimi, si può ritenere che alla farina di frumento sia stato mescolato il mais, perchè questi ammassi sono appunto formati da granuli di mais. L'esame microscopico, che si può fare per controllo, può suggellare la diagnosi.

Ad ovviare poi l'inconveniente che coll'aggiunta d'acqua i granuli si decolorino, si aggiunga il liquido di Ripart e Petit, il quale conserva i colori di anilina.

Questo liquido ha la seguente composizione: acqua canforata gr. 75; acqua distillata gr. 75; acido acetico glaciale gr. 1; acetato di rame gr. 0.30; cloruro di rame gr. 0.30.

Si possono anzi usare addirittura le soluzioni coloranti fatte col liquido suddetto ed avvenuta la colorazione, decantare, aggiungere il liquido puro al deposito e dopo averlo lasciato riposare osservarlo macroscopicamente e microscopicamente.

L'esame dei granuli si può anche fare nell'inchiostro di Cina allestendo i preparati nel modo già detto. Secondo il Pinzani, l'amido di mais « esaminato su fondo nero oltre che presentare il caratteristico contorno poligonale, presenta molto più evidente che non nel semplice esame in acqua gli angoli e gli spigoli del poliedro; per cui mentre l'immagine dell'amido di mais stemperato in acqua può riportarsi il più delle volte alla figura di un poligono e più raramente a quella di un poliedro, invece nell'esame in inchiostro di Cina quasi tutti i granuli di mais presentano evidente la loro forma poliedrica ».

Procedimenti per riconoscere la farina di leguminose aggiunta a quella di frumento.

In quanto all'aggiunta di *farina di leguminose* a quella di frumento, bisogna anzitutto non credere sofisticazione ciò che può derivare da una qualunque casualità, poichè, come bene si esprime il Valenti, è noto che in una farina di frumento, anche la meglio lavorata, si può trovare all'esame microscopico qualche granulo di leguminose, specie di veccia; ma ciò dipende dal perchè non sempre si riesce a vagliare completamente i grani dalle stesse, il che va ben tenuto in conto quando si debbano fare delle perizie per non esser tratti in errore.

I granuli di amido delle leguminose si riconoscono già bene coll'esame diretto nell'acqua glicerinata, ma si possono anche meglio metter in evidenza osservandoli nell'inchiostro di Cina come fa il Pinzani, giacchè nell'ilo si deposita la sostanza colorante rendendolo visibilissimo, diviene più evidente la stratificazione concentrica e inoltre si presentano ancora più splendenti dei granuli di frumento.

Per ricercare la farina di leguminose, secondo Valenti, si può cominciare col prendere un gramma della farina da esaminare e sbatterlo in una provetta da saggio con 10 cmc. di una soluzione a parti uguali di acqua distillata ed acido solforico puro concentrato.

Se la farina è di leguminose, rapidamente il liquido acquista un colorito roseo, che man mano va facendosi sempre più intenso fino a divenire rosso-vinoso. Di più si forma, alla superficie, uno strato denso, costituito da quasi tutta la farina esaminata.

Se la farina al contrario è di frumento puro, acquista, dopo un tempo più lungo che nel primo caso, una lieve colorazione rosea, che si mantiene immutata anche per dodici ore, non raggiungendo così il colorito rosso-vinoso caratteristico della farina di leguminose. Tutta la farina inoltre si discioglie nella soluzione, dimodochè nulla rimane galleggiante alla superficie del liquido.

Se la farina finalmente risulta costituita dalla mescolanza di leguminose e frumento, il liquido, anche quando le proporzioni di farina di leguminose aggiunta sia del 4 %, assume rapidamnete una colorazione, che da rosea diventa, dopo quindici minuti circa, di una tonalità rosso-vinosa non molto carica.

Le due farine si riescono a differenziare, perchè quella di leguminose galleggia, mentre quella di frumento si scioglie.

Si può anche adoperare il metodo del Vogl ed a tal uopo si prendono 2 gr. della farina e si trattano con 10 cmc. del reattivo, si agita e poi si lascia in riposo. Se il liquido si colora in rosso porpora, vuol dire che la farina contiene leguminose.

Però con questo metodo non si può stabilire quanta sia la farina di leguminose aggiunta, mentre con quello del Valenti pare si possa invece stabilire sino al limite del 4 %.

Quando si voglia vedere se la quantità di farina di leguminose è inferiore al 4 %, bisogna ricorrere all'esame microscopico e ricercare i reticoli cotiledonari, dal numero dei quali la diagnosi può essere avvalorata.

Dagli studi del Di Vestea si conosce la resistenza differente, che hanno il reticolo cotiledonare della farina di frumento e quella di leguminose trat-

tati con soluzione di potassa caustica: in una soluzione al 2 % il reticolo cotiledonare del frumento si distrugge in pochissimo tempo, mentre quello delle leguminose non viene distrutto neanche dalla potassa al 10 %. Dalle ricerche del Valenti risulta che anche con gli acidi il reticolo cotiledonare di leguminose si comporta in modo da poterlo differenziare agevolmente da quello di frumento: in soluzioni infatti di acido solforico puro concentrato con l'aggiunta di parti uguali d'acqua distillata, il reticolo delle leguminose persiste a lungo, mentre quello di frumento si distrugge subito.

Ora, si può benissimo o con la potassa o con l'acido solforico, distruggere tutti gli amidi e i reticoli cotiledonari, ad eccezione di quello delle leguminose e quindi farsi un concetto del numero dei reticoli.

All'uopo si prendono 10 gr. di farina e si impastano bene in un mortaio con 50 gr. di acido nella soluzione nota. Si versano in un bicchiere a calice e vi si aggiungono altri 50 gr. della soluzione, agitando con bacchetta di vetro. Si lascia riposare e il deposito si raccoglie con una pipetta e si esamina all'ingrandimento di 40-50 D.

In una farina contenente leguminose nella proporzione del 4 %, si ritrovano in ogni campo microscopico da 4 a 5 reticoli cotiledonari. In proporzioni maggiori la quantità aumenta gradatamente.

Volendo poi distinguere le diverse specie di leguminose che sono state aggiunte, si può dire questo: se la farina è di fagiuolo o fava, con l'acido solforico si ha un colorito prima roseo e poi rosso-vinoso, mentre se è di veccia, dal giallo-bruno a quello dell'infuso di caffè: però non si tratta di dati su cui seriamente fondarsi.

Si può anche ricorrere al procedimento sierodiagnostico. Il Bertarelli ha all'uopo preso in esame le farine di fagiuolo, di pisello, di lenticchia, di fava e di veccia inoculando con gli estratti acquosi di questi semi i conigli per 6-7 settimane. Egli ha ottenuto sieri precipitanti specifici per l'infuso di pisello, fagiuolo e di lenticchie nella concentrazione di 1 a 6000. Questo genere di ricerche con ulteriori studi forse potrà rendere anche più alla mano la ricerca.

Procedimenti per riconoscere la farina di segala aggiunta a quella di frumento.

L'aggiunta di *farina di segala* è molto più difficile a stabilirsi. Si può anzitutto usare il metodo del Wittmart. A tal uopo si sospende 1 gramma della farina sospetta in 50 cmc. di acqua, e si riscalda lentamente a 62° C. Raffreddata la miscela, si esamina il deposito al microscopio. In genere si trovano, inalterati o poco alterati, i granuli di amido di frumento, mentre quelli di segala sono rigonfiati e spaccati.

A questa prima prova di orientazione bisogna poi aggiungere quella del levigamento dell'amido e della misura dei diametri dei globuli più grandi: poichè, come è stato detto altrove, i grossi granuli della segala hanno dei diametri (intorno a 50 μ) i quali non sono raggiunti da quelli più grandi del frumento. Nel contempo in questi granuli si nota con costanza l'ilo crociato o ad ipsilon.

Finalmente si può prendere una certa quantità di farina, setacciarla, raccogliere le masse che rimangono sul setaccio, trattarle con acido nitrico

al 40 % e raccogliere il deposito in cui si trovano i reticoli. Questi reticoli si lavano sotto al campo microscopico e poi si trattano con potassa all'1.5 %. Si distruggono così i reticoli del frumento; quelli che persistono sono della segala, i quali hanno una forma quasi quadrangolare; in confronto a quella del reticolo del frumento, sino a un certo punto sono quindi abbastanza differenziabili.

Speciale importanza poi va attribuita alla ricerca dei peli. Si prendono perciò 3 grammi di farina, si fanno bollire in 100 cmc. d'acqua e si raccoglie un po' della patina che rimane galleggiante e la si esamina al microscopio in una goccia di idrato di cloralio. Tenendo presenti i rapporti tra la grandezza del lume e lo spessore delle pareti, non è difficile poter trovare nei peli un buon dato differenziale.

Finalmente, si ricorre all'esame della crusca, di cui si debbono fare le sezioni come consiglia il Di Vestea. In tal caso, oltre tenere presente lo speciale incurvamento delle cellule del mesocarpo (non dell'endocarpo come si ritiene generalmente), è bene, come dice l'A., fissare la notevole differenza che esiste nella grandezza complessiva delle stratificazioni, compresa quella delle cellule aleuroniche (v. pag. 860) e se le laminette di crusca trascinino seco un cospicuo brandello di tessuto dell'albume, ciò che succede frequentemente nella segala e nell'orzo, ma non nel frumento.

Il Paladino-Blandini per rendere agevole il riconoscimento della crusca indicò un metodo atto a provocare in tutti i granuli la fermazione e la visibilità dell'ilo lineare o a croce. Usando questo metodo e quello dell'osservazione in inchiostro di Cina, il Pinzani indica questo altro procedimento. Un gr. di farina si stempera in una provetta in 10 cmc. di una soluzione di acido acetico in acqua 1:3, si sbatte per qualche minuto e poi si preleva una goccia di questa emulsione che si pone sopra un vetrino portoggetti distendendola in istrato sottilissimo.

A questo scopo, dopo deposta la goccia, si striscia sul vetrino col margine di un altro vetrino tenuto ad angolo acuto rispetto al primo. Così i granuli vengono distribuiti in strato sottilissimo e vengono allora messi a essiccare ad una temperatura di 40°-50°. Una volta essiccato è necessario lavare abbondantemente per togliere l'acido acetico. Quindi si versa una goccia di inchiostro di Cina, si copre col coprioggetto e si esamina. I granuli provvisti del caratteristico ilo stellato appaiono allora molto più numerosi che che non prima di tale trattamento.

Procedimenti per riconoscere la farina di orzo aggiunta a quella di frumento.

L'aggiunta di *farina di orzo* a quella di frumento incontra ancora maggiori difficoltà ad essere diagnosticata.

Se dopo la prova di levigamento, si trovano granuli globoso-lenticolari di forma non perfettamente ovoide o sferica, con ilo lineare, si può sospettare la presenza dell'orzo.

La diagnosi non può essere avvalorata dallo studio della grandezza dei granuli.

Infatti, per dirla col Di Vestea, se è chiaro che con l'aiuto della micrometria quando si trovano corpuscoli lenticolari che oltrepassano 41 μ di dia-

metro, si afferma indubbiamente la presenza di segala, a rigor di termini non si può escludere la presenza del frumento e dell'orzo; come trovando corpuscoli che non oltrepassano i 41 μ si esclude bensì la segala, affermando la presenza del frumento, ma non si può escludere l'orzo. Con l'aiuto della micrometria è quindi possibile una diagnosi completa e univoca solo in caso di farina di puro orzo. Fuori di questo caso è necessario invocare altri criterî che (stando sempre nei limiti di una diagnosi microscopica) si trovano nei caratteri (molto vaghi) dei contorni e dell'ilo dei corpuscoli stessi, nella configurazione e grandezza dei peli e, meglio ancora, nella struttura degli elementi della crusca, la quale presenta il triplice strato di cellule aleuroniche che è assolutamente caratteristico.

In questi ultimi tempi si è ricorso anche al procedimento sierodiagnostico: si sono infatti ottenuti, nei conigli inoculati coll'estratto della farina di orzo, con quello di segale e di frumento, dei sieri che precipitano specificatamente solo i relativi infusi di orzo, segale e frumento: però è ancora da vedere come si diporti il siero su dati infusi fatti con farina di orzo o segala o di ambedue mescolate a quella di frumento.

Il Cao ha tentato di servirsi di siero di cane (trattato con amido macerato o di frumento o di segala o d'orzo) per differenziare fra di loro i diversi granuli. Facendo dei preparati a goccia pendente di siero con aggiunta dell'amido da identificare, e tenendo i preparati a 37°-38°, se l'amido su cui agisce il siero è della stessa specie di quello che ha servito per preparare il cane, i suoi globuli si alterano, si raggrinzano, si fessurano, si sfaldano, molti si addossano l'un l'altro e altri diventano come delle ombre. Ciò succede in 1-3 ore, dopo questo tempo i granuli vanno in completa dissoluzione.

Procedimenti per riconoscere le farine di dura, grano saraceno, avena, riso, aggiunte a quelle di frumento.

Le aggiunte di *dura, grano saraceno, avena, riso,* sono assai meno frequenti e più facili a diagnosticarsi. Giova anzitutto ricorrere al metodo Bartelaer, col quale si può trovare o scartare la presenza del riso. Si prendono 20 gr. di farina e si pongono in acqua a 11°-12° C. per un'ora. Indi si filtra e si aggiunge al filtrato altrettanta soluzione satura di acido picrico. Se non si ottiene alcun precipitato si tratta di sola farina di riso, se lo si ottiene si può trattare di tutte le altre farine poichè queste lo dànno.

Per meglio avvalorare la diagnosi si può poi ricorrere alla prova del levigamento, del Lecanu. Si prendono 15-20 gr. di farina, si impastano con acqua e posti in una pezzuola si spremono sotto uno stillicidio di acqua, sino a separare il glutine, raccogliendo l'acqua di lavaggio contenente tutti i granuli d'amido. Questa si agita bene e si versa, dopo averle aggiunto 1 cmc. di formalina, in un bicchiere a calice di 750 cmc. e si lascia in riposo per 10-12 ore. Dopo questo tempo la decantazione è perfetta e la separazione degli amidi si è fatta per ordine di densità. Allora si osserva il deposito che in genere è diviso in tre strati: il primo, bianco-grigiastro, senza coesione, comprende i globuli di amido più piccoli e più leggeri, mescolati a detriti cellulosici; il secondo, di un grigio sporco, contiene i globuli di media grossezza e il resto dei detriti cellulosici; il terzo, bianchissimo, resistentissimo, contiene i globuli di amido grandi.

Si inclina allora il vaso, si elimina l'acqua e poi dolcemente si accentua l'inclinazione sino a decantare successivamente i tre strati, ognuno dei quali si esamina toccandoli con la bacchetta di vetro e facendo preparazioni che prima si esaminano a 175 D. e poi a 350 e 700. Se vi era stato aggiunto riso, i suoi granuli si trovano in quasi totalità in questo strato e si riconoscono specialmente dai granuli composti Bisogna però, durante queste osservazioni, badare di non confondere il riso coi piccoli granuli del frumento che hanno dimensioni simili a quelli isolati del riso, per quanto siano meno angolosi e uno almeno dei lati sia alquanto arrotondato.

Il procedimento si può controllare anche in altro modo, cioè facendo passare l'acqua amilacea sopra un setaccio n. 240 che si lascia attraversare dai granuli semplici di amido di frumento e trattiene la maggior parte dei tegumenti e dei detriti cellulari. Naturalmente bisogna poi lavare copiosamente il materiale rimasto sul setaccio, muovendolo colle dita frattanto e ciò fino a che l'acqua passa limpida. Nel residuo si trova il riso oppure se invece del riso la sofisticazione è stata fatta col mais, si trova anche quest'ultimo.

Per accertarsi che si tratti di riso, si può ricorrere al procedimento di Bellier. Sopra un coproggetti si deposita una goccia di acqua amilacea, si lascia seccare all'aria la preparazione, si aggiunge una goccia di una soluzione di potassa (gr. 5) e glicerina (gr. 15) + acqua distillata (gr. 85), si copre col portaoggetti e si esamina al microscopio.



Fig. 231.

I granuli di frumento si rigonfiano e dopo qualche ora divengono invisibili mentre i granuli di amido di riso appaiono soli nella preparazione con la loro forma poliedrica più netta perchè sono aumentati di volume ma non tanto da potersi confondere con quelli di mais.

Per differenziare poi i granuli di riso da quelli dell'avena, del grano saraceno, della dura, si ricorre anzitutto all'aiuto della micrometria, la quale mette subito sulla buona strada. Giova però anche servirsi, nei casi dubbi, di altri procedimenti.

Così è vero che i granuli dell'avena sono già distinguibili anche perchè più grandi e perchè hanno forme e contorni variabili, a volte arrotondati, a volte ovoidi, alcune volte sono fusiformi o disposti a calotta ecc., ma si può togliere ogni dubbio sottomettendoli all'azione di una soluzione di potassa al 5 %. Si vedrà allora che i granuli composti si disfanno rapidamente mentre nello stesso tempo si rigonfiano molto: ciò non succede nei granuli di riso.

Riesce anche utile ricercare i peli che sono corti, tozzi e a base curvata nel riso (fig 231 *a*) mentre sono lunghi e sottili nell'avena (fig. 231 *b*).

Così per quanto si riferisce ai granuli di grano saraceno, già si può stabilire un dato differenziale dal fatto che non si trovano grani composti e che i granuli semplici differiscono da quelli del riso

perchè sono generalmente arrotondati e accompagnati da granuli tortuosi più voluminosi che riconducono alla forma di un diabolo. Se vi sono dei grumi nella farina di grano saraceno che possono mentire granuli composti, sotto l'azione della soluzione di potassa, i singoli granuli dei grumi si arrotondano e si dissociano rapidamente. Inoltre nelle cellule amilacee si rende evidente un nucleo cristallino come ha veduto Vogl.

Infine si sa che il grano saraceno possiede granuli grandi 5-8 μ attivi alla luce polarizzata.

Per la dura, occorre tener presente la somiglianza dei suoi granuli con quelli del mais, ma nella dura la mancanza assoluta di forme disposte a pavimento, il maggior diametro dei più grossi granuli, e le diverse grandezze dei medesimi rendono possibile la diagnosi differenziale.

Secondo il Torelli, inoltre la cavità centrale presenta una tale varietà di configurazione, che molto facilmente riesce a costituire uno dei caratteri differenziali più salienti e adatti per distinguere l'amido della dura da quello del mais. Essa non è così uniforme e costante nella dura come nel mais; nelle forme estreme manca del tutto e i granuli presentano l'aspetto di cellule liscie ed appiattite, nelle mediane è visibile e frequentemente è costituita da una sottile ed elegante raggiatura, la quale, partendosi da una cavità centrale, raggiunge la periferia del granulo dividendolo in molteplici regolarissimi segmenti. La varietà di queste forme di granuli non si riscontra nella farina di altri cereali, e costituisce un elemento diagnostico di molto valore. È utile anche ricercare i peli, che si presentano spesso con il lume diviso essendo anche pluricellulari (fig. 231 *b*) nonchè il reticolo cotiledonare lungo le cui pareti si trovano noduli piriformi refrangenti e infine la crusca il cui mesocarpo differisce da quello di altri cereali.

Si potrebbe anche, in casi assolutamente dubbi, ricorrere al metodo sierodiagnostico servendosi del siero di conigli precipitante specificamente l'infuso di mais. È evidente che se questo siero non determina alcun precipitato, nell'infuso di farina non vi sarà dura o mais. Così usando un siero specifico per l'infuso di grano saraceno, si potrà escludere od ammettere l'aggiunta di quest'ultimo alla farina, ecc.



Fig. 232.

2. *Mescolanza con fecole.* — La fecola che più facilmente si trova mescolata è quella di patata. Essa, come del resto tutte le altre, è facilmente riconoscibile per i granuli di amido che non hanno alcuna somiglianza coi granuli dei cereali, delle graminacee e delle leguminose, granuli che facendo la prova del levigamento dell'amido si trovano subito al fondo del primo bicchiere. Ad ogni modo la diagnosi di mescolanza di amido di patata si può avvalorare ricercando i frammenti della buccia, che hanno l'aspetto di mem-

branelle trasparenti, le quali sezionate mostransi costituite da vari filari di cellule tubulari a pareti sottili giallastre sovrapposte le une alle altre e man mano più basse, procedendo dall'interno all'esterno (fig. 232).

3. *Mescolanza con segatura di legno.* — L'aggiunta fraudolenta di polvere di legno alle farine alimentari e al pane è stata accuratamente studiata dal Tavernari, il quale ritiene che il miglior mezzo di ricerca sia quello indicato dal Wiesner; metodo che consiste nel far agire per breve tempo sulle sezioni o sui frammenti vegetali una soluzione alcoolica di floroglucina al 0.01 % e nel trattarli poi con acido cloridrico (con che si ha quasi istantaneamente in tutte le parti lignificate un color rosso traente al violetto), coadiuvato dall'esame microscopico dei frammenti di crusca.

Il Tavernari procede come segue:

Distesa la farina in uno strato uniforme spesso 2 mm. e leggermente compresso, si lascia cadere una goccia di una soluzione alcoolica di floroglucina all'1 % e successivamente, sulla traccia della prima, una goccia di acido cloridrico commerciale diluito al $^1/_2$-$^1/_3$; se evvi della segatura di legno si paleserà quasi istantaneamente, in punti tinti più intensamente in tono di fragola, mentre se si tratta di farina normale non solo la colorazione tarderà a comparire, ma non assumerà mai un grado così forte, lasciandosi solo in parte colorare i frammenti di crusca: d'altro canto il numero dei punti rossi sarà, di fronte alla farina con segatura, molto minore.

Invece della floroglucina, si possono anche adoperare altri reagenti più sensibili. Così il Piutti adopera l'ortobromofenetidina che colora in giallo solo le parti lignificate, mentre quelle cellulosiche rimangono scolorate.

Ma, senza ricorrere all'ortobromofenetidina, è possibile rendere il procedimento alla fluoroglucina più sensibile, col cercare di riunire insieme i frustoli di legno che si trovano in una determinata quantità di farina dopo avere distrutto in essa i corpuscoli di amido. Io mi servo del seguente procedimento.

Prendo 10-15 grammi di farina, li tratto con 500 cmc. di una soluzione di acido cloridrico al 25 % a caldo, avendo cura di rimescolare il materiale in una capsula man mano che si scalda. Poi verso tutta la miscela, ancora calda, in un filtro piano di porcellana bucherellata, coperto di due, tre fogli di carta bibula e applico l'imbuto sopra una bottiglia tubulare per filtrare coll'aiuto dell'aspirazione. Allorchè tutto il liquido è filtrato, verso sulla carta bibula una soluzione alcoolica all'1 % di floroglucina, poi dell'acido cloridrico commerciale. Dopo poco tempo, se evvi segatura di legno, si troveranno una serie di frustoli colorati in rosso fragola. I frustoli di crusca non assumono mai una colorazione di un tono così netto: la maggior parte delle volte anzi non si colorano affatto. In ogni caso la diagnosi si può avvalorare prendendo qualche pezzetto colorato e sottoponendolo all'esame microscopico.

Qualora poi non si possegga il microscopio, si può, dopo filtrato tutto il liquido, lavare bene ciò che rimane sul filtro, facendo passare attraverso il filtro circa 300 cmc. di acqua distillata, poi si toglie la carta bibula, si pone sopra un piatto di porcellana e si secca a dolce calore.

Quando la carta è secca, si inumidisce con una soluzione alcoolica di floroglucina all'1 % acidificata con acido fosforico. Se vi è segatura si ottiene una colorazione rosso fragola, scaldando ancora il piatto. La crusca non assume mai questa colorazione.

4. *Mescolanza con polveri minerali.* — Le sostanze minerali che si sogliono unire alle farine a scopo di frode sono:

α) la creta; β) le terre magnesiache; γ) il gesso: δ) lo spato pesante (solfato di bario); ε) il caolino; ζ) la farina fossile (latte di luna); η) le ceneri di ossa.

Per rintracciare queste sostanze bisogna ricorrere anzitutto al metodo di Cailletet, che consiste nel porre 4-5 gr. di farina in un vaso cilindrico contenente 30 cmc. di cloroformio, agitare e lasciare a sè per qualche ora: dopo questo trattamento le sostanze minerali vanno al fondo del recipiente, mentre l'amido rimane a galla. Occorre però, perchè quest'ultimo fatto si verifichi, che l'amido non sia anidro, ossia che non abbia una densità minore del cloroformio. All'uopo consiglio di porlo precedentemente disteso in apposito piattello entro una camera umida di Tyandall, nella quale si sia versata una piccola quantità d'acqua. Ottenuto il deposito ricercato (che in piccolissima quantità può trovarsi anche normalmente), va esaminato al microscopio.

Per evitare poi che il liquido rimanga torbido, come spesso accade, è bene, come consiglia il Paladino, sottoporre l'amido alla prova del levigamento raccogliendo, però, i granuli in un solo bicchiere e versando il deposito nel recipiente contenente il cloroformio.

Se trattasi di polvere di marmo si osserveranno subito cristalli romboedrici di carbonato di calcio, i quali trattati con H_2S_4O si trasformeranno in cristalli aghiformi di solfato di calcio. Se si tratta di ossa calcinate, si osserveranno degli ammassi di sostanza finamente granulosa giallo-sporca, marrone o nera, i quali trattati con H_2S_4O, diventano il centro della formazione di cristalli aghiformi del pari di solfato di calcio. Se si tratta di altri materiali, questi, trattati con acido solforico o con altri acidi, rimangono insolubili e sono diagnosticabili coll'esame microscopico soltanto quando si tratti di farina fossile, essendo questa formata di scheletri di diatomee.

IV. Riconoscere se la farina sia inquinata da parassiti. — Quando le farine provengono da grani avariati, oppure allorchè non sono state bene conservate, possono presentarsi inquinate da parassiti.

Riguardo ai *grani avariati* si riconoscono abbastanza facilmente.

« I chicchi di grano attaccati dalla volpe o dalla ruggine o da parassiti animali perdono del loro peso, e quindi immergendo una certa quantità di grano nell'acqua, i chicchi ammalati vengono a galla: così possiamo giudicare sino a un certo punto delle qualità del grano e del

suo valore alimentare. Ma i semi conservati in locali umidi e male aerati o in grandi ammassi, subiscono facilmente un processo di fermentazione con lo sviluppo di batteri e di muffe che li rendono impropri al consumo. In questo caso la forma e il peso del chicco non vengono punto cambiati, nè sempre si ha lo sviluppo di odore speciale, che può avvertire della cattiva conservazione del seme. Bisogna allora ricercare se il seme ha conservato la proprietà di germinare, che immediatamente viene distrutta dalla presenza di microfiti, i quali invadono prima il tessuto protoplasmatico dell'embrione. La prova si fa con un apparecchio detto appunto *germinatore* (fig. 233), costituito da un recipiente di vetro, chiuso

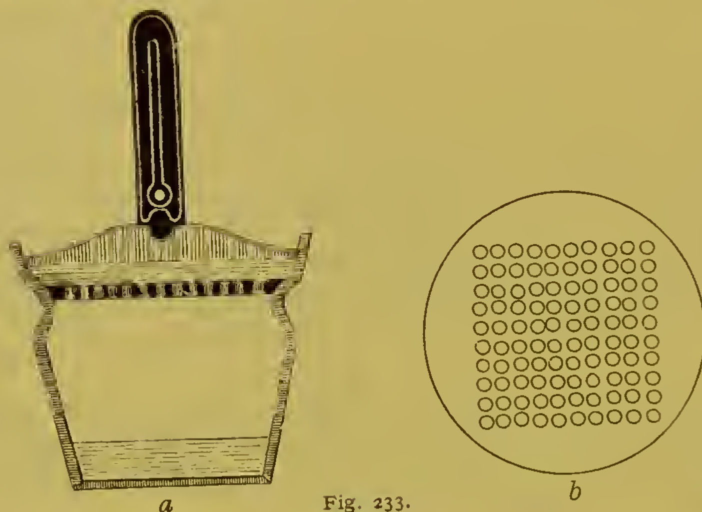


Fig. 233.

da un disco di porcellana con cento forellini scavati ad imbuto, il cui foro più piccolo ha un diametro inferiore a quello trasversale della cariosside dei cereali. Un altro disco di feltro, portante nel centro un termometro, serve da coperchio all'apparecchio. A cinque centimetri circa dal bordo libero del vaso nella parte interna, si nota una sporgenza circolare che serve a sostenere il disco di porcellana, il quale va esattamente a combinare con la parete del vaso.

Si prendono 100 chicchi di grano ad esaminare e si dispongono coll'embrione rivolto in basso nei forellini ad imbuto del disco di porcellana; si rimette il disco a posto, versando un po' di acqua sul fondo del recipiente. Si ricoprono i chicchi con un leggiero strato di terra di giardino umida, e si sovrappone il disco di feltro, abbandonando l'apparecchio in luogo a temperatura conveniente per la germinazione (20°-25°). In questo modo, in opportune condizioni di calore ed umidità, i chicchi sani germinano, e dal conteggio, dopo alcuni giorni, potremo desumere la percentuale dei grani avariati che anche nelle migliori partite di semi, raggiunge sempre il 3·4 % ». (Terni).

Il numero minimo di chicchi che deve germogliare è stato limitato all'80 %, per potersi ritenere il mais sano, limite che però ad alcuni si dimostra troppo basso. (Ori).

Riguardo ai *parassiti delle farine*, generalmente si distinguono in *preesistenti*, quando si trovano già nel seme, e in *sopraggiunti* quando si sono sviluppati propriamente nella farina stessa. Gli uni e gli altri poi possono essere animali o vegetali.

a) Parassiti animali. — I parassiti animali che si possono trovare nelle farine più comunemente sono il *Tyroglyphus farinae*, che è il comune acaro della farina; il *Tenebrio molitor*, allo stadio larvale; un coleottero nerastro fornito di una lunga proboscide, detto *Sitophylus granarius* o *punteruolo*, che si può trovare nelle farine sia allo stato adulto che allo stato larvale; l'*Anguillula tritici*, che nel grano dà luogo alla così detta *gotta del grano* caratterizzata da sporgenze sulla superficie del chicco, dentro le quali si trova un residuo polveroso formato da gomitoli di anguille; la *tignuola* o *alucite* (*Aecophora cereatella*), lepidottero fornito di due grandi ali inclinate a forma di tetto; ed altri parassiti meno frequenti dei suddetti.

Per mettere in evidenza i parassiti animali si possono gettare degli spizzichi di farina in un bicchiere a calice contenente acqua distillata e raccogliere le mondiglie rimaste alla superficie, osservandole in una goccia di potassa al 5-10 % per sciogliere l'amido. Però in alcuni casi, quando per es. si sospetti la presenza di *acari*, è meglio distendere la farina in sottile strato sopra un piatto verniciato bianco, facendole acquistare una superficie uniforme e attendere alquanto. Si vedrà allora che sulla superficie della farina si formano tante piccole protuberanze crateriformi che sono il punto di partenza di solchi che si vanno formando, nei quali con una lente si vedrà qualche cosa muoversi. Si possono allora toccare questi punti con un ago bagnato e osservarli al microscopio. Qualora poi non si voglia attendere, basta spruzzare la farina col reattivo di Vogl e porre al microscopio i puntini neri che appaiono.

b) Parassiti vegetali. — I parassiti vegetali, almeno i più comuni, che si possono trovare nelle farine, provenienti dal seme, sono la *Segala cornuta*, le spore di *Puccinie*, di *Tillezie*, di *Ustilago*. Quelli che si sviluppano dopo, sono diversi batteri, blastomiceti, ifomiceti.

La *segala cornuta*, rappresentante lo sclerozio del fungo detto *Claviceps purpurea*, si sviluppa non solo nella segala, ma anche nel frumento ed è molto importante ricercarla (benchè sia noto che da noi l'ergotismo non si verifica mai o quasi mai e che i nostri grani non sono quasi mai avariati dalla segala), perchè bisogna pensare che molto ne viene importato dal difuori.

Del resto, come fa osservare lo Stagnitta-Balistreri, « se la quantità di segala cornuta che si osserva nelle farine di prima qualità, anche provenienti da grani molto avariati, generalmente non è tale da recare apprensioni dal punto di vista sanitario e nemmeno si può affermare che ne vengano modificate le qualità fisiologiche normali richieste per questo tipo di alimento, non si può dire altrettanto dei residui della burattazione di queste farine, perchè essi contengono la massima parte del cor-

netto sclerotinico, sicchè quando vengono utilizzati per la confezione delle farine di seconda e terza qualità, queste contengono quasi sempre una quantità di segala cornuta assai rilevante. Di più il 95 per cento circa delle farine di qualità inferiore, confezionate coi prodotti di macinazione dei grani esteri, contengono la segala cornuta in quantità raramente inferiore all'1-2 per cento ».

I metodi per la ricerca della segala nelle farine, ossia dello sclerozio del fungo, sono molteplici: chimici, spettroscopici, microscopici. Questi ultimi sono i più sensibili.

Seguendo il metodo Stagnitta, si distende un po' di farina da esaminare in un sottile strato uniforme a superficie liscia, sopra un piatto o una lastra di vetro. Si spruzza la farina fino ad impregnamento col liquido di Vogl badando che le gocciolette di liquido che cadono sulla farina, siano finissime per non alterare la superficie uniforme dello strato. Si riscalda quindi il piatto o la lastra, passandoli sulla fiamma fino a 30°-40° e poi si cercano quei punti che hanno un colorito bruno o rosso vinoso. Con un ago si prendono e si trasportano sopra il vetrino porta-oggetti, in una goccia d'acqua distillata e quindi si sovrappone il vetrino copri-oggetti, comprimendo leggermente ed asciugando ai margini l'eccesso di liquido. La osservazione si eseguisce prima a piccolo ingrandimento (ocul. 3, obb. 2 Koristka) cercando nel campo microscopico i frustoli di color rosso vinoso o bruni, e fissandoli nel mezzo del campo. Indi si pone da un lato, al margine del vetrino copri-oggetti, un pezzetto di carta bibula, in modo da stabilire una corrente sotto il campo del microscopio e dal margine opposto si fa penetrare a gocce la potassa al 20-30 %. Dal frustolo della segala si viene a estrarre la sostanza colorante che ha una tinta violacea smagliante.

Si può ancora viemmeglio avvalorare la diagnosi osservando la struttura del frustolo. All'uopo si lascia agire la potassa per qualche minuto nello stesso preparato, quindi si comprime il vetrino coproggetti in modo da schiacciare e distendere il frustolo in esame, e si osserva a più forte ingrandi-

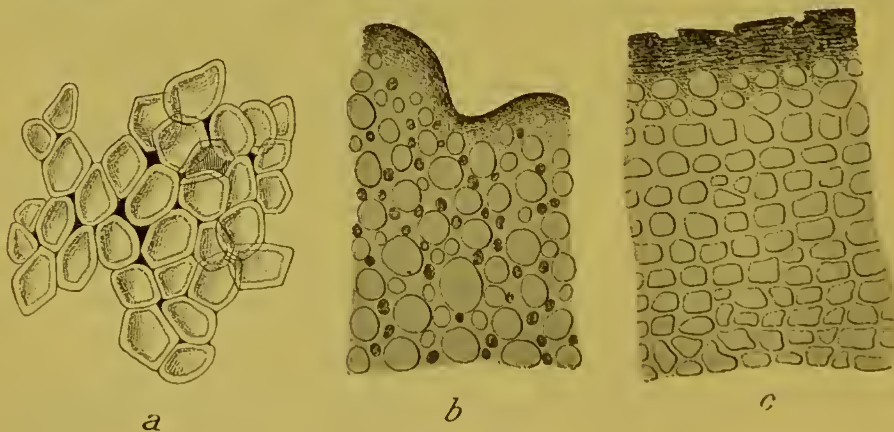


Fig. 234.

mento. Si notano allora (fig. 234, *a*) cellule poligonali e ovoidi a doppio contorno con contenuto brillante nei punti in cui gli olii estrattivi non sono stati ancora saponificati dalla potassa, e ciò quando il frustolo appartiene

alla periferia del cornetto e quando cade nella osservazione di piatto; se invece aderisce al frustolo anche la parte midollare del cornetto e la osservazione cade nel senso longitudinale, appariscono le cellule allungate e gli ifi dicotomi del micelio, pure con contenuto splendente.

Si può anche raccogliere qualche frustolo e sezionarlo. In tal caso si troverà: « nei tagli trasversali (fig. 234, *b*) presenza di numerose cellule rotonde o poliedriche a pareti spesse, incolori nella parte centrale, colorate in viola verso la periferia e nei tagli longitudinali (fig. 234, *c*), presenza di cellule allungate nel senso dell'asse maggiore dello sclerozio ed irregolarmente sinuose, contenenti gocciole di olio refrangenti di diversa grandezza, le quali spesso mascherano il tessuto cellulare, per cui è consigliabile trattare prima con etere che le discioglie e permette di veder bene quest'ultimo ».

Bisogna però ricordare che la reazione con la potassa, specie nelle farine setacciate con buratti finissimi, nelle quali la parte periferica del cornetto difetta, non si verifica che in qualche frustolo. In questi casi bisogna ricercare quei frustoli che posseggono la parte periferica dello sclerozio, sul quale si potrà far agire la potassa caustica. Soltanto nei casi in cui la segala e la farina siano state molto male conservate, la reazione potrà mancare; ma allora basterà l'esame microscopico del frustolo a togliere ogni dubbio.

Si può anche facilitare la ricerca della segala con una prima reazione macroscopica e cercare di eliminare l'amido sino dal principio della operazione.

A tal uopo al metodo Pratesi-Di Vestea per il distendimento della farina in sottile strato sopra un piatto di porcellana, seguito dallo spruzzamento del materiale col reattivo del Vogl, sostituisco il setacciamento della farina attraverso un setaccio a larghe maglie, sopra un piatto coperto di carta bibula a vari strati e bagnata abbondantemente di una soluzione di acido nitrico puro al 20 %. L'acido nitrico in questa proporzione distrugge gli amidi dei cereali, lasciando intatti i frustoli di segala che assumono un colorito rosso-fragola dopo un certo tempo e spiccano sul fondo leggermente giallo della farina bagnata. Ottenuta questa reazione si può prenderne qualcuno con un ago e osservarlo sotto al campo microscopico (ocul. 3, obb. 2 Koristka) tra un portoggetti e un coproggetti. Se esso apparterrà alla parte periferica dello sclerozio. sarà colorato in un bel tono rosso-fragola. Si può anche precedentemente versare la potassa sui punti rossastri che si trovano sulla carta bibula, e allora si otterrà che essi diverranno scuri e spesso circondati, i più grossi specialmente, da un aloncino sfumato violaceo.

Ad avvalorare la diagnosi, si possono anche fare altre due osservazioni, consistenti nel setacciare sopra un piatto, bagnato con potassa al 20 %, la farina sospetta e ripetere la stessa operazione sopra un piatto contenente acido nitrico puro. Nel piatto contenente la potassa si noteranno, dopo un po' di tempo, scaldandolo, dei punti violetti circondati da un aloncino sfumato dello stesso colore, e nel piatto contenente acido nitrico, gli stessi punti ma rossastri con alone sfumato dello stesso colore.

Quando poi la farina sia stata mal conservata e i frustoli di segala non assumano la colorazione rosso-fragola, dopo il trattamento con l'acido nitrico al 20 per cento, non rimane che prendere tutti i frustoli giallo-bruni o scuri e osservarli al microscopio per vedere se hanno il tipico aspetto de frustoli di segala.

Per stabilire poi la quantità di segala può servire lo stesso metodo indicato dal Di Vestea per l'agrostemma: mescolando l' 1 ‰ di segala alla farina, io ho trovato, in media, nel campo di 16 cmq., 62 frustoli. Lo Stagnitta avendone trovati 5 quando la segala vi era mescolata nelle proporzioni del 0.1 ‰, ossia 50 nelle proporzioni dell' 1 ‰, vi sarebbe una differenza di 12 frustoli in più. Si comprende del resto come questi dati siano passibili di qualche differenza, a seconda della mescolanza più o meno ben fatta della farina e della segala.

Le *Pucciniae*, le *Tilletiae*, le *Ustilago* sono spore di diversi funghi i quali producono rispettivamente la *ruggine*, la *carie*, il *carbone del grano*. Esse si rinvengono abbastanza facilmente nelle farine, specialmente se si ha cura di stenderle in sottile strato sopra un piatto bianco verniciato e spruzzarle con acqua: si troveranno allora qua e là puntini nerastri, che, in piccolissime quantità, non debbono far considerare le farine dannose alla salute, specie se sono dati da puccinie e tillezie. Le ustilago solo potrebbero esserlo perchè si sa che tali spore contengono una sostanza tossica e ad azione paralizzante, solubile in acqua. (De Marchis).

All'esame microscopico si presentano:

le *Pucciniae* (fig. 235, *a*), come corpi ovoidali, con o senza picciuolo, a parete liscia od un poco rugosa, a contenuto granuloso, color ruggine;

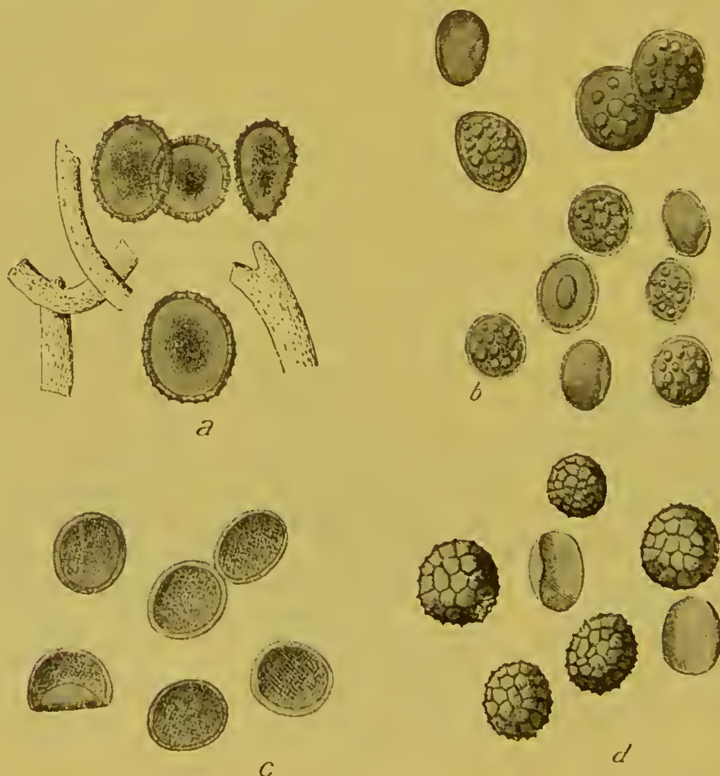


Fig. 235.

le *Tilletiae* (fig. 235, *b*), come corpi sferici con leggera ondulazione periferica e con contenuto reticolato (dentro le cui maglie si trova una sostanza protoplasmatica bruna) della grandezza di μ 15-18, quindi assai

più grandi di quelle di *Ustilago carbo* con le quali molti trattatisti, non tenendo conto delle dimensioni, le confondono costantemente;

le *Ustilago*, come corpi generalmente un po' ovoidali, piccoli, di colorito nero ebano, a pareti liscie contenenti corpicciuoli sferici risplendenti (fig. 235, *c*), e ciò nel caso si tratti dell'*Ustilago carbo*, grandi μ 5-8; ovvero, nel caso si tratti di *Ustilago maïdis* (fig. 235, *d*). corpi sferici, con membrana presentante all'esterno sporgenze a guisa di aculei ed a contenuto di colore marrone oscuro, grandi μ 9-13.

I *Batteri* che si possono trovare nelle farine, sono stati studiati solo nella farina del mais e in rapporto all'etiologia della pellagra: non sembra però sinora si siano trovati altro che dei microrganismi comunissimi e specialmente il *B. mesentericus vulgatus* e il *Proteus vulgaris* (*B. vulgare*).

Nel mais guasto si è parlato di uno speciale bacillo, il *B. maïdis*, ma esso non è che uno dei mesenterici (il *fuscus* forse) e non ha importanza alcuna, checchè sia stato scritto in proposito

I *blastomiceti* che si possono trovare nelle farine, furono del pari poco studiati. Il Peters ne differenziò, nelle farine in fermentazione, quattro: non è difficile anche rinvenire abbastanza frequentemente il *rosa* che è tanto comune nell'aria.

Gli *ifomiceti* che si possono trovare nelle farine sono rappresentati pure dalle comuni specie di *Penicillium glaucum*, *Mucor racemosus*, *Mucor mucedo*, *Aspergillus glaucus* e *niger*, *Rhizopus nigricans*, ecc., la cui presenza in primo tempo è rivelata da micelî (e bastano questi da soli per ritenere la farina avariata) e, quando la farina è vecchia, solo da spore, ossia da corpiccioli rotondi, refrangenti, che molto facilmente si confondono con goccioline di grasso, se non si fa attenzione alla loro membrana bene distinta.

La ricerca degli ifomiceti nelle farine ha in questi ultimi tempi assunto grande importanza, specie dopo gli studi fatti sulla tossicità delle spore di una varietà di un penicillo glauco e di altre muffe in relazione, secondo alcuni, con la pellagra.

Diventa quindi importante saper dire se in una farina si trovino delle muffe e se tra queste muffe vi siano più o meno abbondanti le spore di questa varietà di penicillo.

Per ricercare le muffe nelle farine, si può seguire il seguente procedimento : si prende un po' della farina sospetta, si essicca a 30°-40°, si disgrega in un modo qualunque, magari pestandola in un mortaio, e poi si getta a pizzichi in un bicchiere a calice della capacità di mezzo litro, contenente acido nitrico al 50 %, agitando con bacchetta di vetro, perchè non si formino dei grumi Si lascia stare in riposo per un'ora, dopo di che si osserva il deposito al microscopio. (Pastore).

Se la farina è ammuffita si noteranno le spore delle muffe, e, in condizioni favorevoli, può capitare di vedere dei micelî o dei frammenti

di essi. Bisogna però tener presente che può nascere un po' di confusione tra i reticoli amiliferi che rimangono intatti, ammassati, e gli ifi; solo rilevando alcune particolarità, quali la grossezza maggiore dei micelî, le forme clavate, i setti, è facile evitare gli errori.

Va anche notato che quando si ha una farina normale, di frumento ad esempio, dopo il trattamento con l'acido nitrico, oltre ai detriti e al reticolo amilifero, osservansi, al microscopio, dei corpiccioli rotondi, piccolissimi, refrangenti, che potrebbero a prima giunta credersi delle spore. Ma nella massima parte dei casi questi corpicciattoli sono sempre più piccoli delle spore degli ordinarî penicilli, aspergilli e delle mucorinee; hanno un contorno non perfettamente rotondo e sono di grandezza varia. Le spore invece sono perfettamente rotonde, spesso unite a due, a tre, a catena o ad ammassi, identiche nelle loro dimensioni e aggruppate talvolta attorno ad un micelio.

Del resto, ove nascessero dei dubbi, si possono prendere 10-15 grammi di farina, trattarla con l'acido, lavarla con alcool ed etere, poi osservare il deposito al microscopio. Se vi sono spore, non potranno confondersi con tali elementi, poichè questi scompaiono.

Si può anche colorare il materiale, per esempio con la crisoidina, la quale, in soluzione idroalcoolica, tinge splendidamente in giallo le spore e i reticoli amiliferi.

Per la diagnosi di farine avariate, si consiglia anche il metodo dello Gnequen, basato sull'uso del *bleu coton* (*bleu di china, bleu all'acqua 6 B, bleu marino extra*) che facilita l'esame microscopico. Se ne fa una soluzione con gr. 0.15 in 100 cmc. di acido lattico, in mortaio a freddo, soluzione che si filtra dopo 24 ore. Per esaminare una farina se ne pone una piccola quantità in una goccia del reattivo sopra un portoggetti; si copre col coproggetti e si esamina a 100 diametri, dopo aver riscaldato lievemente sino ad emissione di vapori, sopra una piccola lampada.

Le spore e i micelî appariranno colorati in bleu cupo in mezzo ai granuli di amido incolori e trasparenti.

Quanto alla ricerca della speciale varietà tossica di penicillo basta prendere (Di Pietro) un po' di farina, sbatterla in acqua distillata sterilizzata e con una pipetta del pari sterilizzata, versarne qualche decimo di centimetro cubo in piastre di Petri già contenenti raffreddato uno strato di agar-agar comune cui sia stato aggiunto un po' di acido tartarico e glucosio (v. questo vol., *Batteriologia*). Dopo 24 ore a temperatura ordinaria (25°) si sviluppano colonie ramose, bianche nella superficie superiore, giallicce nell'inferiore, che sporificano rapidamente, le quali non fondono la gelatina ordinaria o acida.

Con le spore del penicillo, si seminano poi diversi tubi di agar solidificato a becco di flauto e quando si è sviluppata una abbondante patina sporificata, la si estrae e si dà a mangiare a una piccola cavia. Dopo 1-2 ore cominciano negli animali delle scosse e dei tremori e un barcollamento caratteristico. Se la dose è forte l'animale muore in col-

lasso dopo 8-10 ore; se è debole si salva. In ogni modo la diagnosi è fatta.

In alcuni casi di mescolanza di farine di frumento potrebbe anche occorrere di dover ricercare altre muffe particolari. È questo il caso in cui alla farina di frumento sia stata aggiunta farina di patate appassite.

La muffa che si deve ricercare è la *Phytoptora infestans*. In altri casi si tratta invece di batteri; ma allora la ricerca microscopica non è sufficiente.

Pane e Paste.

Nell'esame microscopico del pane e delle paste vanno tenuti presenti tutti i quesiti che si presentano quando si procede all'esame di una farina.

Generalmente l'esame si pratica per ricercare:

1° quale sia la farina di cui sono composti il pane o la pasta;
2° se alla farina usata siano mescolati elementi di semi eterogenei;
3° se alla farina usata sia stata aggiunta farina di altra specie;
4° se il pane o la pasta siano alterati da parassiti.

Quando si voglia sapere la specie o le specie di amido di cui è fatto il *pane*, non devonsi esaminare gli strati superficiali che sono stati più sottoposti all'azione del calore, ma la mollica e possibilmente quei *punti* che sono rimasti non cotti e vi si trovano sempre, spappolarli in acqua e osservarli; quando si tratta di *pasta* pestarne alcuni pezzi in un mortaio riducendoli in polvere finissima e poi fare preparati includendoli in acqua glicerinata.

Si può anche fare una pallottola del peso di 10 gr. che si lava come se fosse un pastone di farina sotto un sottil filo di acqua. Se il pane è secco se ne pesano 10 gr., si rammolliscono nell'acqua e si lavano comprimendoli fra le dita sul setaccio n. 240 sino a che l'acqua di lavaggio passa chiara. Se il pane è puro nel deposito non si osserveranno che granuli di frumento più o meno deformati. Se il pane è preparato con farina di frumento mescolata con altre farine bisogna praticare l'esame microscopico di ciò che è passato nell'acqua di lavaggio e di ciò che è rimasto sul setaccio, nello stesso modo come si fa per le farine.

Il residuo rimasto sul setaccio non deve contenere che ammassi di glutine più o meno imbruniti dalla cottura e dei detriti cellulosici provenienti dai tegumenti del frumento. Se invece sono state aggiunte altre farine, come mais, riso, in questi residui si trovano i loro granuli di amido (metodi ufficiali francesi).

Quando si voglia sapere se al pane siano mescolati elementi eterogenei, si può essiccarne la mollica, tritarla ed esaminarla, come se fosse farina, al microscopio e sottometterla anche alle già indicate prove microchimiche.

Nel caso nella presenza di gittaione si può adoperare il metodo del Rusconi: 10 gr. di pane finamente grattugiato si mettono in un Erlemeyer e vi si aggiungono 20 cmc. di una miscela di alcool e cloroformio (alcool a 95' cmc. 390, cloroformio cmc. 100). Si scalda all'ebollizione e poi si filtra rapidamente per filtro a pieghe asciutto. Si ripete l'operazione altre due

volte impiegando 10 cmc. di miscela alcool-cloroformica per volta. Si evapora a bagnomaria in capsuletta e si riprende con 3 cmc. di soluzione di cloruro sodico all'1 %, cercando di esaurire con bacchetta di vetro il residuo tenue rimasto nella capsula. Si filtra per carta previamente bagnata colla stessa soluzione di cloruro sodico, si neutralizza. se occorre, ed a 2 cmc. di liquido raccolto si aggiunge una goccia di globuli sedimentati. Per il rimanente si fa come per le farine.

Quando si voglia sapere se il *pane* sia alterato da parassiti, esaminare preferibilmente gli strati superficiali ove generalmente si noteranno delle macchie di vario colore che potranno mettere sulla strada, ammenochè non si tratti di parassiti già preesistenti nelle farine perchè allora è più conveniente esaminarne gli strati interni ossia la mollica.

Quando si voglia vedere se alla farina siano commiste sostanze estranee, come polveri minerali, ecc., io ho trovato utile tagliuzzare la mollica, se il pane è fresco, frammentarla se è secco, e poi essiccarla a modico calore, per es. a 37°-40° o meglio ancora in un essiccatore ad acido solforico, magari facendovi il vuoto. Si tritura quindi la mollica essiccata, in un mortaio, si passa a un fine setaccio metallico e la polvere ottenuta si considera come fosse farina, sottomettendola, cioè, a tutti quei procedimenti che servono a discoprire le adulterazioni e le sofisticazioni delle farine, nonchè le loro alterazioni.

Lo stesso trattamento si fa subire alla pasta: soltanto in alcuni casi, in cui è difficile renderla così secca da ridurla triturabile, si può ricorrere alla raschiatura, che si ottiene con un bisturì; raschiatura che a sua volta va essiccata e triturata in un mortaio.

Il Paladino-Blandini espone poi un metodo di analisi microscopica del pane, che si fonda nel considerare il pane come fosse un tessuto.

Si tagliano piccoli cubetti del pane e si immergono in gelatina fusa (gelatina 5, acqua distillata 10, glicerina 20, acido fenico gocce 1-2) tenendoli 30-60 minuti a 50°-59°. I blocchetti bene impregnati di gelatina si passano nella serie degli alcools fino ad indurimento, poi in trementina e quindi per 12 ore in paraffina. I blocchetti imparaffinati si sezionano al microtomo e le sezioni si fissano al vetrino con albumina Mayer più acqua calda, si tengono in stufa per 2 ore e poi si colorano in fuxina carbolica (Ziehl) per mezz'ora a 55°, si lavano in acqua. si decolorano in alcool a 70° acidificato con HCl fino a tinta rossa, si tornano a lavare con acqua, si passano nel colore di contrasto che è una soluzione acquosa di violetto di metile per 1-5 minuti, si disidratano in xilolo e si montano in balsamo del Canadà.

I granuli di amido restano colorati in rosso con la fuxina, perfettamente riconoscibili e misurabili; solo alcuni restano quasi scolorati o assumono lieve tinta violetta.

Gli *elementi cruscali*, meno i peli, assumono una tinta bleu carica.

I *frammenti dei peli* conservano una bella tinta rossa e a più forte ingrandimento (ocul. 4, obb. 5 Kor.) è visibile anche il loro lume.

Nelle sezioni si osservano anche quando ci sono, vivi, colorati in rosso cupo, micelî di funghi, spore di parassiti che non si colorano.

Secondo l'A. con questo mezzo si riesce perfettamente a differenziare il *pane perglutinato* nel quale non si vedono affatto globuli di amido, il *pane integrale* abbondantissimo di elementi cruscali, il *pane fatto con farine setacciate* (pane di Vienna, francese), costituito quasi esclusivamente da

amido, i diversi pani di segala, mais, orzo, ghianda, castagne, dai caratteri dei singoli elementi cruscali, ecc.

Va da sè, poi, che prima di tutti questi trattamenti sia il pane che la pasta debbono essere osservati, magari con l'aiuto di una lente, per vedere se presentino alterazioni macroscopiche per opera di parassiti animali, del punteruolo per es., o per altre cause.

Nel praticare l'esame microscopico tanto del pane quanto della pasta, bisogna ricordare costantemente che molti granuli appaiono rigonfiati, deformati, con spaccature, per effetto delle manipolazioni cui è stata soggetta la farina. Così pure, i grandi granuli del frumento si rigonfiano, presentano una striatura più o meno visibile (ai principianti ricordano i granuli di fecola di patata), oppure si fessurano, a croce o ad ipsilon, ricordando i granuli di segala. Visti poi di lato, i granuli di frumento possono presentare una larga fessura che ricorda l'ilo dei granuli di orzo, ecc.

Tenendo presenti le dimensioni dei granuli si può però facilmente escludere che i granuli appartengano alla segala e all'orzo, come tenendo presenti i caratteri dell'amido di patata, e il modo di diportarsi verso la luce polarizzata, si può escludere che si tratti di granuli di questa fecola.

Inoltre è opportuno avere cura speciale di ricercare, quando si tratta di pane, se vi si trovi commisto del talco, la così detta *polvere da pane*. Secondo l'Anfosso, l'esame microscopico giova moltissimo a discoprirla, specialmente, se, come io consiglio, si dissecca prima il pane, si tritura e si tratta, come se fosse farina, col metodo di Cailletet. La presenza del talco è rivelata da aghi o prismi (spicole) grandi mm. 0.03-0.07 × 0.001 oltre ad altri elementi lamellari e a corpuscoli di forma quadrilatera.

Nel pane si nota anche una flora microbica non indifferente: all'interno secondo Paladino-Blandini non si trovano che saccaromiceti, vivi, e il b. sottile, le forme viventi di microrganismi sono però numerose nel pane ricco d'acqua, deficiente di cottura. Secondo Rousset anche dopo cottura (temperatura di 101-100° per 40-50 minuti, della mollica) il b. della tubercolosi conserva la sua virulenza.

ESAME MICROSCOPICO DEL CAFFÈ, DEL THÈ, DEL CACAO, DEL CIOCCOLATO, DELLO ZUCCHERO, DEL MIELE.

Caffè.

I frutti del caffè, sprovvisti del loro pericarpo, sono rappresentati dai così detti chicchi del caffè, ossia da grani verdastri generalmente più lunghi che larghi, convessi da un lato, piani e solcati longitudinalmente dall'altro.

Istologicamente parlando, sono costituiti dall'albume del seme, generalmente ancora rivestito dallo spermoderma, ossia:

1° da un tessuto di cellule poliedriche, l'una disposta accanto all'altra, a pareti spesse circa 6 μ, colorate leggermente in verde giallastro, contenenti gocciolette oleose e granulazioni di varia natura (amidacee, ecc.);

2° da un tessuto costituito di uno strato di cellule appiattite, allungate, a pareti non bene distinguibili, formanti nel loro insieme una membranella trasparente aderente all'albume e di uno strato di elementi allungati (fino a 500 μ) e molto stretti (30-40 μ), fusiformi, a parete spesso finestrata trasversalmente, formanti nel loro insieme una membrana che rappresenta lo strato più esterno dello spermoderma.



Fig 236.

Questi chicchi adoperansi triturati, torrefatti, allo scopo di fare il noto infuso di caffè. All'esame microscopico, oltre ad una serie di corpi amorfi e di goccioline oleose, non dovrebbero mostrarsi costituiti che dal reticolo dell'albume (fig. 236, *a*) e dalle cellule fusiformi dello spermoderma (fig. 236, *b*) (raramente si vede lo strato interno di quest'ultimo).

Questi elementi si possono mettere bene in evidenza trattando il materiale triturato con alcool o etere o potassa (1 di materiale su 4 di solvente). Ciò si fa agitando il miscuglio per breve tempo in una provetta, indi si lascia depositare, si decanta il liquido, si sostituisce acqua e si sottopone all'esame microscopico.

Si possono anche, come consigliano i trattatisti (Lehmann, Villiers, Collin), far bollire 10-15 gr. di polvere di caffè in 600-700 cmc. di acqua per 10 minuti in una capsula di porcellana: poi si decanta e si lava la polvere ripetutamente con acqua sinchè questa non si tinge più.

L'esame microscopico dovrebbe servire a riconoscere di quale specie di caffè si tratti; ma, in realtà, esso non serve che a mettere in evidenza sia le adulterazioni che si fanno del caffè in chicchi, sia quelle che si fanno del caffè torrefatto e macinato.

1. ESAME MICROSCOPICO PER RICONOSCERE LA QUALITÀ DEL CAFFÈ. — Di questo studio si è recentemente occupato il Tusini, il quale ha praticato sezioni dei grani di caffè verdi, dopo averli fatti bollire in potassa al 10 % per mezz'ora. Queste sezioni, esaminate al microscopio, dopo passaggio in alcool e xilolo ed incluse in balsamo di Canadà, mostrano ben misurabili le cellule dell'albume e dello spermoderma.

L'A. avrebbe trovato le seguenti dimensioni medie:

TABELLA 90.

Qualità del caffè	Grandezza in μ delle cellule		
	del reticolo alla periferia	in prossimità dell'ilo	dello spermoderna
Abissino	62 × 45	52 × 39	275 × 32
San Domingo	60 × 40	56 × 44	300 × 33
Portorico	60 × 35	63 × 35	267 × 29
Moka	59 × 41	56 × 43	255 × 32
Santos	57 × 45	61 × 43	355 × 32
Venezuela	50 × 42	44 × 34	320 × 30

Queste dimensioni si mantengono, secondo l'A., su per giù abbastanza costanti finchè si tratta di chicchi di caffè verdi: però a voler giudicare a quale qualità appartenga un caffè torrefatto, occorre riferirsi alle dimensioni delle cellule dello spermoderma, le quali sarebbero in media le seguenti:

Nel caffè	abissino	μ	196 × 30
»	Moka	»	165 × 29
»	S. Domingo	»	184 × 30
»	Portorico	»	222 × 27
»	Santos	»	212 × 30
»	Venezuela	»	238 × 30

2. ESAME PER RICONOSCERE LE ADULTERAZIONI DEL CAFFÈ. - *Adulterazione del caffè in chicchi.* — Consistono nel mescolare, più raramente nel sostituire completamente, i chicchi di vero caffè torrefatto, con grani che hanno pressochè forma simile, fabbricati con varie materie (pasta di farine diverse o per lo più di cereali, di argille, ecc.).

Questa falsificazione si riconosce già molte volte dal colorito e dalla forma ed in ogni caso perchè per lo più i chicchi falsificati gettati in uu

bicchiere di acqua vanno a fondo e sono anche facilmente sgretolati e polverizzabili al contrario di quelli del vero caffè, salvo il caso non si tratti di caffè già bollito e rimesso in commercio.

Quando poi questi dati non fossero sufficienti, basta ricorrere all'esame microscopico della polvere che si ottiene dalla loro pestatura, nella quale non si devono trovare che gli elementi caratteristici del caffè.

Adulterazioni del caffè polverato. — Sono numerosissime: basti dire che il Chiappella ha trovato adulterato il caffè che si vende a Firenze nel 75 % dei casi, con due, tre, quattro e persino con cinque materiali combinati.

Tali adulterazioni consistono generalmente nel mescolare alla polvere di caffè i così detti succedanei del caffè, le così dette *radici similari*, cioè le radici di cicoria, di tarassaco, di scorzonera, di tragopogon, di sonchus, di barbabietola da zucchero; i fichi, le ghiande dolci torrefatte, le farine, le fecole, la segatura di legno, i semi di arachide; i nocciuoli di olive, di susine, di noci, di dattero; i semi del corugo e del sorgo; le rape e le carote essiccate; polveri minerali, polveri di mattone, e perfino quella di sughero.

Qualora si sospetti la presenza di elementi estranei nel caffè si può cominciare col versarne una certa quantità in un bicchiere a calice contenente una certa quantità d'acqua, osservando poi se il materiale stesso va al fondo e l'acqua si tinge; nel caso che questo succeda si può ritenere che il caffè sia stato falsificato (ammenochè non si tratti di fondo di caffè essiccato e rimesso in commercio), dacchè il vero caffè galleggia e non si tingono che do o qualche tempo, leggermente in giallognolo, gli strati superficiali del liquido.

È utile anche seguire il procedimento indicato dal Lehmann. ecc. In tal caso, dice il Chiappella, « se il caffè è puro, la polvere esaurita si mostra composta esclusivamente di granellini a tinta sensibilmente omogenea e di consistenza dura, fra i quali si possono osservare dei frammenti di spermoderma del caffè, trasparenti e sottilissimi. Se invece al caffè sono state aggiunte polveri vegetali estranee, si potranno nella maggior parte dei casi, osservare dei frammenti più o meno voluminosi, di consistenza molle, friabili, di colore diverso dei granellini di caffè, per lo più giallastro-pallido, che affiorano per il loro minor peso alla superficie della polvere di caffè più pesante e che facilmente si lasciano ammassare sui margini della capsula, imprimendo ad essa un qualche leggiero movimento circolare. Se però l'aggiunta al caffè consta di elementi legnosi, duri, sclerosati, allora questi per il loro peso e la loro consistenza non si lasciano separare, come i precedenti, dai frammenti del caffè, e occorre un esame minuzioso di qualunque frammento sospetto ».

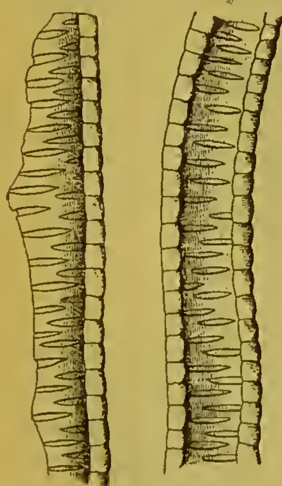


Fig. 237.

Per fare poi la diagnosi del materiale col quale è stata adulterata la polvere di caffè, occorre conoscere quali sono gli elementi caratteristici delle varie sostanze che si usano a scopo di frode.

Gli elementi caratteristici delle *radici della cicoria torrefatta* sono rappresentati da frammenti di elementi cilindrici con striatura trasversale (fig. 237), rappresentanti pezzi del tessuto della radice. Possono anche trovarsi, ma molto difficilmente, cellule parenchimatose poliedriche a pareti sottilissime, frammenti di vasi latticiferi, ecc.

Gli elementi caratteristici dei *fichi torrefatti* sono rappresentati da cellule grandi, irregolari, poliedriche, con molti vasi latticiferi, grandi, a contenuto granuloso, anastomizzantisi fra di loro (fig. 238, *a*), oltre ad altri elementi di secondaria importanza: fibre vascolari (fig. 238, *b*), ele-

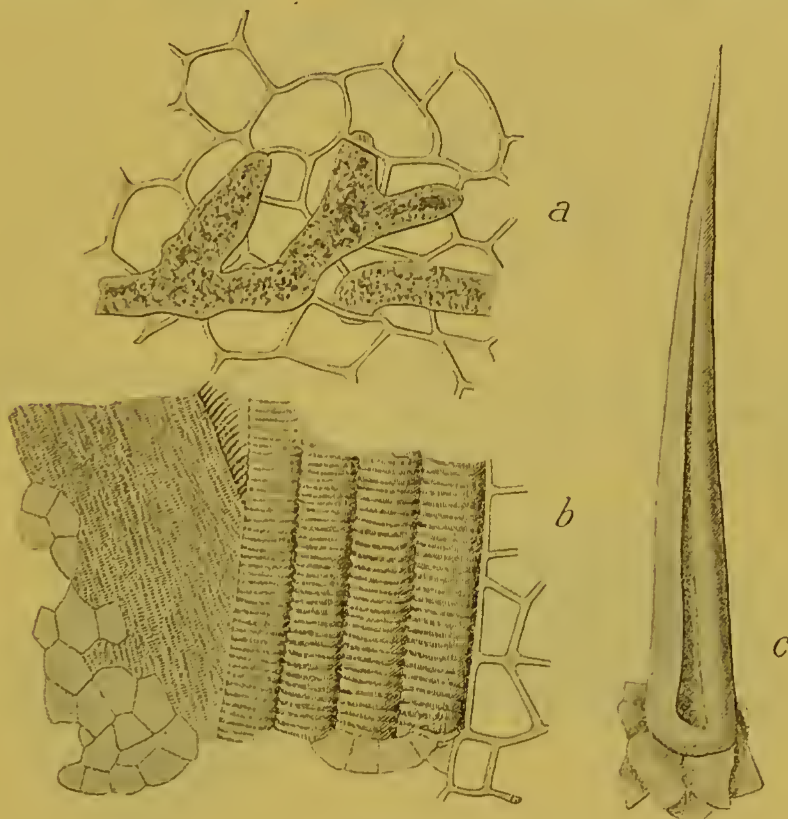


Fig 238.

menti cellulari poliedrici, spesso con cristalli di ossalato di calcio, peli (fig. 238, *c*), ecc.

Gli elementi caratteristici delle *ghiande dolci torrefatte* sono rappresentati da grandi cellule poliedriche racchiudenti granuli di amido (figura 239), irregolarmente ovalari, a ilo puntiforme od a fessura centrale ed a stratificazione concentrica qualche volta evidentissima, oltrechè di elementi di secondaria importanza, fasci vascolari, ecc.

Gli elementi caratteristici delle *carote torrefatte* si riconoscono per la presenza di un tessuto parenchimatoso con cellule a maglie ovali e pareti sottili, contenenti degli aghi giallastri e per la presenza di elementi tracheali irregolari con fessure lineari visibilissime.

Gli elementi caratteristici dei *noccioli di olive torrefatti* (fig. 240) si ri-

conoscono specialmente per la presenza di lunghe fibre fusiformi, incolori, non fenestrate che si trovano insieme a molte cellule sclerosate a pareti spesse, con fessure nella parete interna.

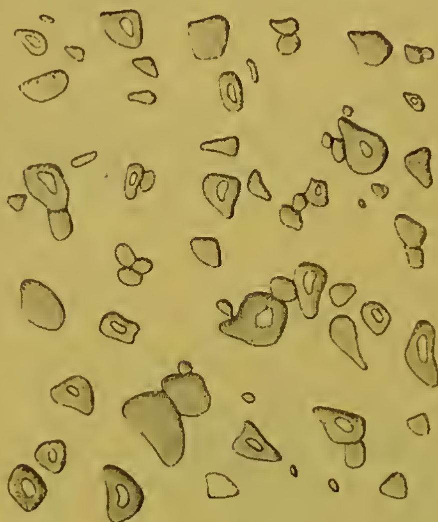


Fig. 239.

In quanto agli elementi caratteristici di altri materiali che servono per adulterare il caffè vanno ricordati i noccioli dei datteri, che nel caffè di Firenze sono stati trovati frequentissimi. Effettivamente, dice il Chiappella, il nocciolo del dattero torrefatto e macinato offre coi suoi frammenti di colore marrone scuro, di consistenza dura, coriacea, pesante e difficilmente intaccabili da un ago, una grande rassomiglianza coi frammenti dell'albume del caffè.



Fig. 240.

Si distingue però assai facilmente per la struttura dell'albume e per la conformazione degli elementi sclerosati.

Per gli altri materiali, mi limiterò a riportare la tabella del Chiappella in cui sono indicate le dimensioni da lui trovate dai vari elementi della radice di cicoria ed alcune delle similari, le quali dimensioni conducono facilmente a delle diagnosi differenziali per il caso che fosse necessario eseguirle.

TABELLA 91. *Dimensioni dei vari elementi anatomici delle radici di cicoria e similari.*

Radice di	Dimensioni	Vasi punteggiati									Vasi latticiferi			Cellule suberose		
		Articoli			Punteggiature			Perforazioni								
		minima	massima	media	minima	massima	media	minima	massima	media	minima	massima	media	minima	massima	media
		μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ	μ
Cicoria . .	Lunghezza	90	270	170	3	9.5	6.6	18	26	22	..	..	..	30	54	42
	Larghezza	30	84	50	1.5	3	2.2	12	18	15	6	18	10	30	42	35
Tarassaco .	Lunghezza	72	252	170	9	21	15.3	21	39	29	..	..	..	18	66	39
	Larghezza	27	84	53	1	3	2.5	18	30	23	3	15	7	30	48	36
Scorzonera	Lunghezza	156	282	220	5	27	16	21	36	31	..	..	..	45	90	66
	Larghezza	18	87	60	1	3	1.5	15	27	21	7 5	30	20	27	60	36
Tragopogon	Lunghezza	78	222	150	6	21	13	24	30	26	..	..	..	30	84	55
	Larghezza	18	72	40	1	2	1.5	15	22.5	19	3	21	10	24	48	35
Sonchus. .	Lunghezza	120	327	236	3	6	4.6	12	30	21	..	..	..	36	60	48
	Larghezza	20	54	38	2.5	5	3.6	9	24	15	6	30	16	27	42	33

La *segatura di legno* si rivela per le molteplicità delle fibre legnose che si trovano nelle preparazioni.

La *polvere di sughero* (fig. 241) (trovata dal Bajardi nel caffè torrefatto macinato) è più difficile ad essere diagnosticata, tanto più che è una adulterazione assolutamente eccezionale e che si fa tutta a danno della povera gente, la quale compera piccole quantità di caffè già pesato.



Fig. 241.

Per riconoscere questa sofisticazione, secondo il Bajardi, i procedimenti da adottarsi sarebbero facilissimi qualora si trattasse di una semplice sostituzione di polvere di sughero a quella del caffè, tenendo conto della proprietà della polvere di sughero di galleggiare nell'acqua fredda o calda, acidificata o non acidificata, senza, anche dopo pochi giorni, tingere l'acqua sottostante, ciò che non succede alla polvere del caffè, la quale a lungo andare, solo in parte galleggia e finisce col tingere l'acqua in giallo più o meno carico.

Ma in fatto, non è certamente possibile che venga in mente a qualcuno di sostituire tale polvere a quella di caffè; tutt'al più può venirvi aggiunta.

Occorre anzitutto cercare di separare questa polvere dal caffè e per far ciò bisogna spossare anzitutto la polvere di caffè in esame, di maniera che vada a fondo nell'acqua. Si prendono quindi 5-10 gr. di essa e si fanno bollire in 50 cmc. di acqua, meglio se acidulata con HCl; dopo 8-10 minuti di bollitura si versa il materiale in un bicchiere a calice e si lascia raffreddare; la polvere di caffè torrefatta e spossata va a fondo, la polvere di sughero invece rimane a galla.

Se rimangono dei dubbi, si può versare il liquido contenente la polvere invece che in un bicchiere a calice in un imbuto al cui collo si attacca un tubo di gomma stretto da una pinza. Appena formatosi il deposito si apre la pinza, si fa cadere il deposito insieme a dell'acqua in un sottostante bicchiere a calice, ripetendo l'operazione più volte, con l'aggiunta di nuova acqua, fino a che si è sicuri che tutto il caffè spossato sia venuto a separarsi. Sopra un filtro di carta si raccoglie ciò che è rimasto galleggiante e lo si secca a dolce calore in una stufa qualsiasi; seccato si raccoglie e un pizzico si dibatte in una provetta contenente dello xilolo. In questo liquido il caffè spossato va a fondo, mentre la polvere di sughero rimane costantemente a galla.

Si può poi avvalorare la diagnosi di polvere di sughero prendendo un pizzico di quella che è rimasta secca sul filtro e stropicciandola sopra un foglio di carta bianca; in tal caso la carta si viene a tingere in nero. La polvere di caffè, spossata o no, tutt'al più imprime alla carta un colorito marrone.

Trattando poi la polvere, che rimane galleggiante nell'acqua bollente o meglio ancora nello xilolo, in un vetrino da orologio con acido cromico, possibilmente in soluzione satura, se è polvere di sughero, i frammentini

non si sciolgono anche dopo 24 ore di azione a freddo, se invece si tratta di polvere di caffè si forma una poltiglia densa, omogenea, bruna. Esaminando al microscopio un po' del materiale indisciolto, i frammentini di sughero appaiono costituiti da un reticolo a pareti sottilissime che circonda degli spazi poligonali; se si tratta di polvere di caffè, nel campo microscopico non si scopre nulla di ben definito.

Questo metodo si può anche adoperare direttamente sulla polvere del caffè sofisticato, facendo agire sopra pizzichi della medesima la soluzione satura di acido cromico ed esaminando dopo 24 ore una goccia del materiale al microscopio. Però è sempre meglio cercare di selezionare prima il sughero dalla polvere per giungere a risultati più positivi.

Si potrebbero anche raccogliere i frammentini di polvere rimasti galleggianti sull'acqua bollente e farne delle sezioni, trattando poi queste, sotto il campo microscopico, con Sudan III, col quale si sa che solo le pareti cellulari suberificate assumono una colorazione rosso carminio caratteristica; però nel sughero torrefatto questa colorazione non è così netta e in ogni caso il procedimento è troppo incomodo perchè possa applicarsi nella pratica.

Le *polveri minerali* si riconoscono perchè sono particelle generalmente opache, amorfe, che stridono sotto il vetrino coproggetti comprimendole leggermente; sono quelle che cadono più presto al fondo gettando il caffè torrefatto in un bicchiere di acqua. Trattate con acidi spesso dànno effervescenza per la loro trasformazioni in sali, oppure rimangono inalterate.

Adulterazioni del caffè spossato. — Il *caffè spossato* o *esausto*, da me stato studiato, sfugge generalmente all'ispezione dei vigili e alle preliminari ricerche di laboratorio, sia esso puro, perchè galleggia sull'acqua e perchè all'esame microscopico si mostra costituito dai soli elementi del caffè, sia mescolato con altre sostanze, come cicoria, ecc., perchè allora la prova del bicchiere e la prova microscopica conducono a ritenerlo caffè torrefatto, semplicemente adulterato.

Ora il *caffè torrefatto spossato* trovasi sotto forma di *chicchi interi*, *chicchi in frammenti*, *chicchi macinati* o *polvere di caffè*.

I *chicchi interi torrefatti spossati* non differiscono dai chicchi ordinari se non perchè hanno perduto in gran parte la lucidezza caratteristica.

Del resto, gettati in un bicchiere contenente acqua a temperatura ordinaria, o anche calda, galleggiano, sempre che siano bene asciutti. Dopo macinati, la polvere di caffè da essi proveniente galleggia benissimo nell'acqua fredda, tingendo lentissimamente gli strati d'acqua sottostanti, salvo il caso che non siano stati più volte spossati, poichè allora l'acqua può anche non tingersi affatto. Nell'acqua calda sopra i 50° e nella bollente, sia o no acidificata con HCl al 5-10 %, i frammenti più grossi precipitano al fondo abbastanza rapidamente. Esaminata al microscopio la polvere in discorso, senza bisogno del trattamento con l'etere o colla potassa o coll'alcool, si vedono i caratteristici elementi del caffè con i loro particolari di struttura (fenestrazione, ecc.), abbastanza bene, perchè parte dell'olio è portata via nelle prime bolliture.

I *chicchi frammentati torrefatti spossati* è più raro poterli osservare; ma il fatto di trovarli in frammenti più o meno grossolani induce già l'ufficiale sanitario a un esame accurato.

Se si tratta di caffè spossato, tali frammenti sono sforniti assolutamente di lucentezza. Gettati in un bicchiere contenente acqua alla temperatura ordinaria galleggiano. Se l'acqua è calda, e acidificata con *HCl* al 5-10 %, molti pezzetti vanno a fondo: però questa prova riesce assai meglio se si macinano. L'acqua fredda o non si tinge affatto o si tinge con straordinaria lentezza.

Esaminati al microscopio presentano gli elementi caratteristici del caffè molto bene distinti nei loro particolari.

Il *caffè torrefatto macinato e spossato o esausto — fondi di caffè —* viene smerciato molto comunemente e non è facile riconoscerlo dal vero caffè non spossato, tanto più che spesso i rivenditori lo mescolano col caffè torrefatto macinato non spossato. Esso però ha un colorito meno scuro, tendente al marrone, e non ha l'odore gradevole caratteristico del caffè. Versato in un bicchiere a calice contenente acqua alla temperatura ordinaria, galleggia e generalmente anche dopo molte ore non tinge l'acqua sottostante.

Se l'acqua è bollente o calda, meglio se acidificata con acido cloridrico al 50 %, vanno a fondo, in pochi minuti i pezzetti più grossi, formando un deposito che, esaminato, mostrasi costituito dagli elementi caratteristici del caffè con i loro particolari di struttura chiaramente visibili, come se fosse sgrassato.

A riconoscere se la polvere di caffè sia stata o no spossata e adulterata con altri materiali, i procedimenti sono i seguenti:

1. *Per riconoscere se una polvere di puro caffè sia stata spossata.*

a) La polvere di caffè si versa in un bicchiere a calice contenente acqua calda, acidificata o non con *HCl* al 5-10 %. In 30 minuti circa, se il caffè è spossato, si depositano al fondo i pezzetti più grossi; se non lo è, si nota una leggera deposizione di frustoli, lungo le pareti, una tinzione giallognola dell'acqua, ma nessun frammento di chicco va a fondo, salvo qualche pezzetto molto grosso, specie se il caffè è stato macinato da molto tempo;

b) La polvere di caffè si versa in un bicchiere contenente acqua alla temperatura ordinaria (15°-25° C.). L'acqua, se si tratta di veri fondi di caffè, non si tinge neanche dopo 12 ore; se si tratta di polvere di caffè proveniente da chicchi frammentati torrefatti e spossati, si tinge, ma sempre più lentamente e meno di quel che faccia la polvere di vero caffè non spossato.

c) La polvere di caffè si tratta con xilolo od alcool assoluto (servono imperfettamente e non sono consigliabili l'etere solforico, l'etere di petrolio e la benzina), prendendone un pizzico e sbattendolo entro una provetta contenente 10-15 cmc. del liquido, per 1-2 minuti. Se il caffè è stato spossato va tutto al fondo, mentre se il caffè non è stato spossato si forma uno strato galleggiante costituito da tutti i frammenti più grossi.

d) L'infuso a freddo di 4 ore di 5 gr. di polvere di caffè in 100 gr. di acqua distillata, filtrato, con l'aggiunta di soluzione acquosa satura di laccamuffa, assume una colorazione rossastra se il caffè non è stato spossato, violacea invece se è stato spossato. L'operazione si fa aggiungendo in una buretta graduata una certa quantità di soluzione di laccamuffa a 25 cmc. dell'infuso in un cilindro di vetro graduato. Si fa cadere perciò a goccia a goccia la soluzione di laccamuffa, agitando il liquido dopo l'aggiunta di ½ in ½ cmc. Se il caffè è spossato, difficilmente si arrivano ad aggiungere 2 cmc. di soluzione di laccamuffa a 10 cmc. di infuso, senza ottenere una colorazione violetta. Se il caffè non è spossato, si possono aggiungere 10-15 cmc. di soluzione di laccamuffa sino a riempire il recipiente senza riuscire a ottenere colorazione violacea.

e) L'infuso a freddo di 4 ore di 5 gr. di polvere di caffè in 100 cmc. di acqua distillata, filtrato, si tratta con nitrato mercuroso e dalla quantità del precipitato si arguisce se il caffè sia stato spossato o no. All'uopo si prendono 10 cmc. dell'infuso, si versano in tubo graduato della capacità di 10 cmc. e del diametro di 1 cm., quindi si aggiungono 2 gocce di nitrato mercuroso. Si forma un precipitato che dopo varie ore (è bene attendere non meno di 6 ore) si depone al fondo, sebbene qualche fiocchetto rimanga aderente alle pareti del vaso. Se il caffè è stato spossato, difficilmente in un tubo graduato delle dimensioni indicate si ottiene un precipitato più alto di 1 cm., mentre se il caffè non è stato spossato, i precipitati sono sempre superiori ai 2 cm.

2. *Per riconoscere se una polvere di caffè risulti da una mescolanza di caffè spossato e caffè non spossato.*

Il caffè torrefatto esausto, sia in chicchi, sia macinato, viene mescolato a caffè torrefatto non esausto. Riconoscere la frode in tal caso non è facile.

Se il caffè è in chicchi, si possono scegliere quelli di aspetto opaco, macinarne una ventina separatamente l'uno dall'altro e poi fare per ciascuno la prova dell'alcool o quella del xilolo.

Sia che questo primo saggio dia risposta positiva, sia che non la dia, si prendano 10 gr. del caffè, si macinino e si gettino tutti a poco a poco in un bicchiere a calice grande, contenente acqua calda acida o no. Se fra i chicchi ve ne erano degli spossati, i loro frammenti più grossi vanno a fondo, sicchè dopo 30 minuti, se si è formato un deposito nel bicchiere a calice, può ritenersi che tra i chicchi ve ne siano degli spossati. Occorre però procedere anche a qualche altra ricerca, dopo aver raccolto i frammenti precipitati.

A tal uopo, invece di un bicchiere a calice, è bene servirsi di un imbuto di vetro fornito nel collo di un rubinetto a smeriglio a forame largo o di un imbuto al cui collo si applica un tubetto di gomma, che si chiude con una pinza a molla. Trascorsi i 30 minuti, si apre il rubinetto o la molla e si lascia passare il precipitato in un sottostante recipiente, che generalmente è un imbuto piano a molti fori, coperti di carta bibula in varî strati.

Se il caffè è già polverizzato, non occorre fare alcuna operazione preliminare; si versa addirittura nel bicchiere a calice contenente acqua calda o

nell'imbuto, come ho ora indicato, e si raccolgono i frammenti rimasti sulla carta bibula.

Sia nel primo caso che nell'altro, le carte bibule si pongono a essiccare, e, quando il materiale è asciutto, si fa la prova dello xilolo o dell'alcool e quella dell'acqua fredda per osservare se, dopo molte ore, si tingono gli strati dell'acqua. Nei casi dubbi occorre raccogliere anche il caffè rimasto galleggiante sull'acqua calda, asciugarlo e procedere alle stesse prove, le quali debbono, invece che di caffè spossato, dimostrare la presenza di caffè non spossato. Raramente col materiale raccolto in superficie e al fondo, succede di dover procedere a ulteriori ricerche; in ogni caso si può farne l'infuso (gr. 2 50 in 50 di acqua) e dopo 4 ore fare la prova della laccamuffa e del nitrato mercuroso.

Bisogna però che il materiale non sia rimasto a lungo nell'acqua calda (non più di 15-20 minuti), altrimenti anche quest'ultima prova può rimanere dubbia.

3. *Per riconoscere se una polvere di caffè risulti dalla mescolanza di caffè torrefatto macinato spossato con l'aggiunta di materie eterogenee, o di queste più caffè non spossato.*

I fondi di caffè smerciati come polvere di caffè, sono molto spesso mescolati con sostanze estranee, e per lo più con cicoria.

L'esame microscopico facilmente le disvela, unito ad altri saggi più o meno complessi sulla densità degli infusi e sul loro colorito. In pratica senza dover ricorrere al microscopio si può in qualche caso usufruire del colorito del liquido che filtra dopo il trattamento dell'infuso con nitrato mercuroso, o con acetato di piombo, o con cloruro stannoso, poichè, mentre tale liquido filtra limpido, se l'infuso è di caffè, filtra invece più o meno giallo se l'infuso è di caffè e cicoria. Il metodo però non è molto sensibile e non giova neppure concentrare l'infuso per renderlo tale. Si può ridurlo alquanto più sensibile, aggiungendo qualche goccia di cloroformio, sbattere in una provetta e poi lasciare in riposo il liquido filtrato per 5-6 ore. Se si forma un deposito lattescente, si può sospettare la presenza della cicoria: se però al disopra di questo il cloroformio rimane limpido, non si può giungere a tale conclusione. (Clavenzani).

Dopo questa prova preliminare si versa la polvere in un bicchiere contenente acqua fredda e si lascia a sè per 12 ore. Se evvi caffè spossato, questo rimane galleggiante. Si raccoglie allora quest'ultimo e lo si sottopone alla prova dell'alcool o del xilolo: se riesce positiva, il caffè può dirsi spossato.

Nel caso poi che fondi di caffè e cicoria siano mescolati a caffè torrefatto macinato non spossato, si riconoscono i due caffè assai semplicemente. Si getta un po' della polvere in un bicchiere a calice o meglio nell'imbuto già descritto, contenente acqua calda. Si raccolgono i pezzetti precipitati, si seccano e si gettano in un altro bicchiere contenente acqua fredda. Se fra i pezzetti si trova del caffè, questo rimane galleggiante, mentre la cicoria va a fondo. Nel primo bicchiere rimarrà quindi galleggiante il caffè non spossato, precipiteranno il caffè spossato e la cicoria; nel secondo rimarrà galleggiante il caffè spossato e andrà a fondo la cicoria.

Naturalmente, bisogna procedere all'esame microscopico di particelle del materiale che rimane galleggiante e di quello che precipita, per giungere ad una diagnosi esatta.

Thè.

Le foglie della *Thea sinensis* vengono disseccate, dopo essere state alquanto torrefatte, e adoperate per fare il noto infuso di thè. Anche questo materiale alimentare viene facilmente adulterato o mescolandovi foglie di altre piante, o con le foglie di thè di qualità inferiore, opportunamente colorate in modo da dar loro l'aspetto di quelle di qualità superiore.

Per riconoscere se le foglie appartengono realmente alla *Thea sinensis* non sempre basta l'esame macroscopico, perchè spesso esse sono frammentate: si rende necessario sezionarle e sottoporle all'esame microscopico. Si tratta di foglie di thè quando in una sezione trasversale si osservano i seguenti strati (fig. 242):



Fig. 242.

1° l'epidermide superiore senza stomi, formata da un solo strato di cellule, ricoperte di una spessa cuticola;

2° due strati di cellule a palizzata con grani di clorofilla;

3° un parenchima a lacune costituito da cellule rotonde con meati tra di loro, contenenti clorofilla o cristalli di ossalato di calcio;

4° grandi cellule sclerosate, ramificate, che attraversano il parenchima e lo strato delle cellule a palizzata per sostenere la cuticola;

5° l'epidermide inferiore costituita da piccole cellule rettangolari con stomi e con peli unicellulari, specialmente nelle foglie giovani.

Le adulterazioni e le sostituzioni del thè in commercio sono molte e non sempre facili a scoprirsi. Il Pellegrini, che se ne è occupato,

consiglia di mettere in rilievo i caratteri macroscopici e quelli microscopici.

Per l'*esame macroscopico*, rammolliti i pezzi per ½-1 ora in acqua distillata a 60°, se ne dispiega bene ogni parte su una lastra di vetro e si notano i caratteri più salienti. Già la semplice ispezione mette in grado di poter escludere molte delle foglie che nulla hanno di comune con quelle del thè, come le foglie trigone del pioppo, le lobate della quercia, le fortemente dentate della fragola, le lanceolate e strettissime del litospermo, le lobate a lobi dentati del cratego. Anche le foglie della *Rosa canina*, della *Veronica officinalis*, del *Prunus spinosa* è facile riconoscerle per la esiguità delle dimensioni. Le specie le cui foglie potrebbero comparire simili se non identiche a quelle del thè (*Laurus*, *Fagus*, *Sambucus*, *Fraxinus*. *Salix*, ecc.), si differenziano osservando le nervature e la configurazione del lembo. Questo è intero ed ondulato nel lauro e nel faggio, con dentellature rudimentali nel *Salix caprea*, a denti marcatissimi nel sambuco e nel frassino.

Per l'*esame microscopico*, rammolliti i pezzi come sopra, si eseguono sezioni trasversali giovandosi a preferenza di quelli che rechino breve tratto della nervatura mediana, giacchè è in corrispondenza della medesima che, quando esistono, sono disposti gli elementi sclerosi.

Quindi, si prende nota dello spessore delle foglie, perchè, secondo il Pellegrini, i confini entro cui lo spessore oscilla nelle singole specie, permette di riunire in tre gruppi le foglie: nel primo quelle che misurano meno di 120 μ di spessore, nel secondo quelle che misurano fra 120 e 200 μ, nel terzo quelle che misurano da 200 μ in su.

Nel secondo gruppo, in cui si trovano le foglie della *Thea sinensis* e delle sue varietà, stanno quelle della *Rosa canina*, del *Fraxinus excelsa*, del *Quercus robur*, del *Crataegus exycantha*, della *Veronica officinalis*, del *Populus malus*, del *Laurus nobilis*, dell'*Olea europæa*.

Per differenziarle si cercano i peli, giacchè variano nelle singole foglie: sono lunghissimi pluricellari nel faggio, pluricellari e più corti nella quercia, clavati e ghiandoliferi nella rosa. Per la veronica, i cui peli potrebbero confondersi con quelli unicellulari del thè, non si trovano stereidi nello spessore dello strato lacunoso. Nel *Populus* si trova che l'uniformità degli strati a palizzata è rotta a intervalli dalla presenza di grosse cellule sferiche completamente prive di clorofilla, nel *Crataegus* e nel *Fraxinus* si nota l'esistenza di elementi ramosi componenti l'ipofillo.

Cacao e Cioccolato.

I semi torrefatti della *Theobroma cacao*, polverizzati, costituiscono la polvere di cacao. Con questa poi, aggiunta di zucchero e aromatizzata, si fanno i pani e le tavolette di cioccolato.

Nella *polvere di cacao* si rinvengono una serie di elementi (fig. 243), oltre i quali non debbono trovarsene altri, e cioè:

1° granuli d'amido: secondo Vallin i grani sono semplici, grandi 4-8 μ e composti di grani di 3-4 μ in numero di 4 a 10 diversamente disposti; il loro contorno è netto nel cacao moderatamente torrefatto.

rigonfi, deformati ad ilo largo nel cacao trattato col carbonato di potassa o al vapor d'acqua sotto pressione; spesso sono anche circondati da un anello di sostanza albuminoide;

2° varie specie di cellule, cioè cellule amilifere, poliedriche, contenenti una sostanza violetta, cellule appiattite bluastre, cellule allungate disposte a vari strati, cellule sclerosate con pareti spessissime, frammenti di trachee;


Fig. 243.

3° i corpuscoli di Mitscherlich, che sono dei peli pluricellulari, giallastri, i quali sono molto rari a trovarsi, perchè appartengono allo strato più esterno del seme, mentre la polvere di cacao deriva in massima parte dal grano privo del suo involucro.

Tutti questi elementi si mettono bene in evidenza trattando la polvere di cacao e rispettivamente i semi o le tavolet e pestate con alcool od etere e poi con acqua, così come si procede per il caffè.

La sofisticazione più frequente consiste nel mescolare alla polvere di cacao, quella della scorza del seme; è allora, checchè si dica in contrario, che sono numerosissimi i corpuscoli di Mitscherlich e che si vedono gli elementi caratteristici della scorza, cioè detriti costituiti da cellule parenchimatose a pareti rifrangenti, cellule sclerose piccole e regolari, trachee riunite in gruppi voluminosi.

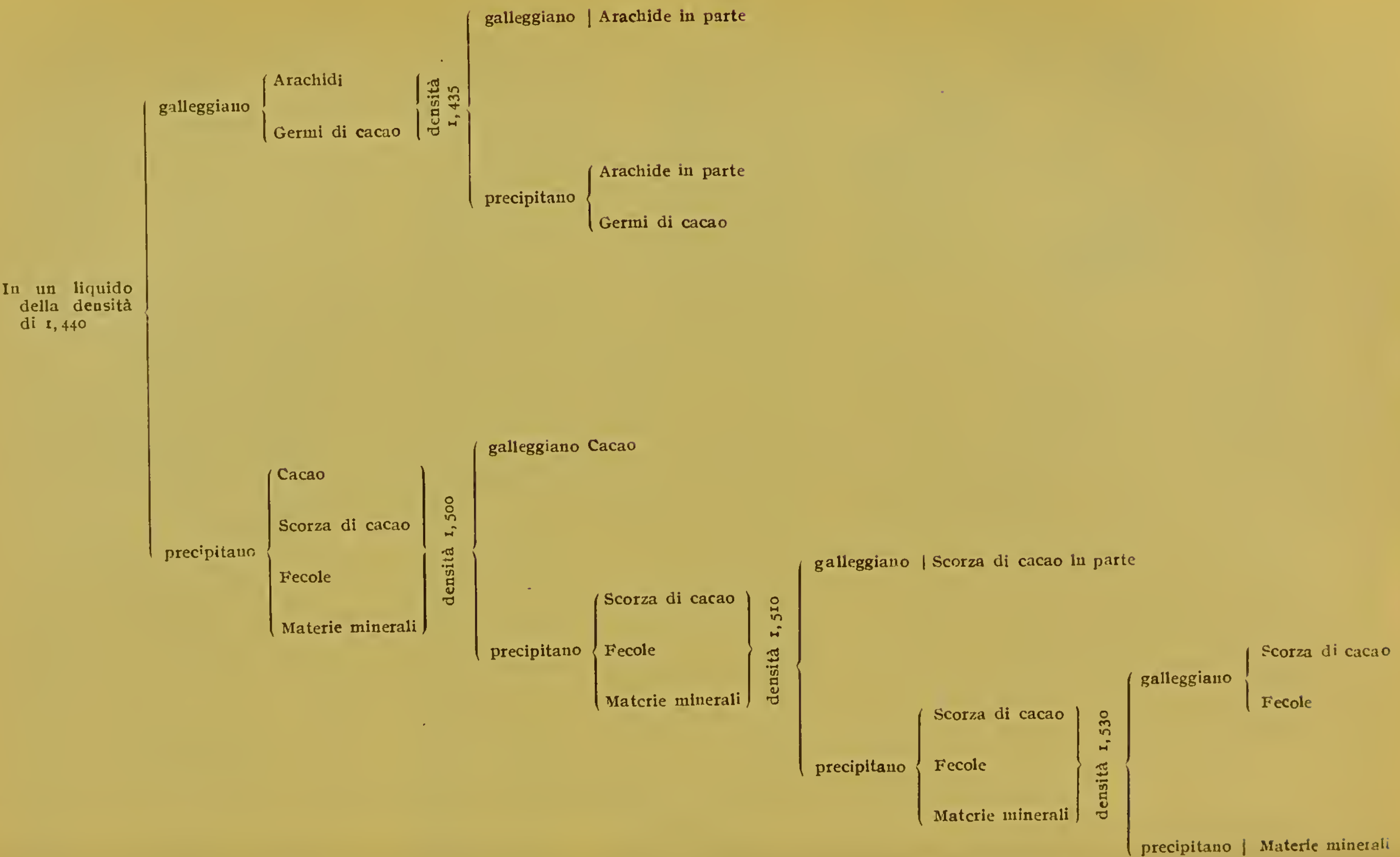
Segue la sofisticazione, con l'aggiunta di amidi, per lo più fecole, di cui già si ha un indizio ponendo un po' di cacao in una provetta contenente acqua e fattolo bollire versandovi (dopo avere aumentato il volume del liquido con aggiunta di molta acqua) qualche goccia di tintura di iodio. Se l'amido era stato aggiunto, il liquido rimane bleu: in caso diverso si ha una *sfumatura* bleu che scompare agitando. L'esame microscopico poi completa la ricerca.

Altre adulterazioni della polvere di cacao sono date dal cocco, dalle mandorle, dalla sansa di arachide, ecc., polverizzati. La diagnosi della specie di ciascuna adulterazione non è sempre facile. In ogni caso, se necessiti, giova ricorrere a trattati speciali: qui sarebbe troppo lungo l'enumerarle.

Si può però già bene orientarsi passando all'esame microscopico della polvere dopo averla versata in liquidi di diversa densità 1,330; 1,435; 1,500; 1,510, poichè ciò permette la separazione di diversi elementi come si può rilevare dalla tabella seguente di Bordas e Touplain.

Per ottenere i detti liquidi si prende del tetracloruro di carbonio secco, del quale si diminuisce la densità al grado voluto con benzina o toluene.

Inoltre la polvere deve esser disseccata, ciò che si fa in corrente d'aria calda fino a raggiungere i 100° e la separazione dei liquidi di diversa densità dei materiali si fa per mezzo della centrifugazione.


In un liquido della densità di 1,440
galleggiano
Arachidi
Germi di cacao
densità 1,435
galleggiano | Arachide in parte
precipitano
Arachide in parte
Germi di cacao
precipitano
Cacao
Scorza di cacao
Fecole
Materie minerali
densità 1,500
galleggiano Cacao
precipitano
Scorza di cacao
Fecole
Materie minerali
densità 1,510
galleggiano | Scorza di cacao in parte
precipitano
Scorza di cacao
Fecole
Materie minerali
densità 1,530
galleggiano
Scorza di cacao
Fecole
precipitano | Materie minerali

Nel *cioccolato* si trovano gli stessi elementi della polvere di cacao, più quelli che vengono aggiunti per renderlo anche più piacevole al palato, che bisogna badar bene di non confondere con sofisticazioni. Queste sono numerosissime, poichè il materiale si presta molto a commetterle e a mascherarle. Si può trovare dell'amido e specialmente amido di castagna, segatura di legno, polvere di marmo, ecc., per la ricerca dei quali si procede come abbiamo già indicato nei capitoli riguardanti l'esame del caffè.

Zucchero, Miele, Confetti.

Lo *zucchero* viene spesso mescolato con sostanze diverse, come amidi e polvere di marmo.

Per riconoscere queste sostanze si scioglie lo zucchero in esame in un bicchiere a calice contenente acqua e si esamina sia il deposito, sia ciò che può rimanere alla superficie del liquido, o meglio, si pesano 25 gr. di zucchero, si disciolgono in acqua, portando al volume di 250 cmc., si prendono delle porzioni di questa soluzione e si centrifugano, esaminando poi il deposito al microscopio. Se si tratta di amido la diagnosi è ovvia, se si tratta di marmo basterà aggiungere una goccia di acido solforico al preparato per avere i cristalli aghiformi di solfato di calcio.

Il *miele* viene per converso il più delle volte sofisticato collo zucchero di canna. Si riconosce la sofisticazione perchè, accanto ai cristalli



Fig. 244.

romboidali piatti e sottili o allungati o aghiformi del miele, che sono misti a granuli di polline (fig 244, *A-a*) e spesso a cera, si trovano i grossi cristalli dello zucchero che risaltano benissimo (fig. 244, *B*). Quando questi non si trovino, ma si vedano degli elementi vegetali più o meno numerosi e dei granuli di amido, la sofisticazione è stata fatta con sciroppo di fecole.

Data la presenza di granuli di polline, sarebbe interessante riconoscere quelli che ingeriti sono causa di disturbi gastrici, come i granuli dell'*Aconitum napellus* e *lycottonum*, ecc.; però non è sempre possibile

farlo, specie perchè occorre avere in questo genere di ricerche una pratica che non è facile acquistare.

Si è anche tentato di riconoscere se il miele sia puro o sofisticato con altre qualità di zucchero, servendosi della sieroreazione. A tal uopo il Rigler inocula conigli ripetutamente con miele puro, e col siero di questi animali tratta soluzioni di miele puro e di miele sofisticato; ma il procedimento è utilizzabile solo per riconoscere le sostituzioni del miele con materiali che non lo contengono affatto: se si tratta di una semplice mescolanza, per lo più si finisce coll'ottenere lo stesso risultato che si ha quando si tratta di miele puro.

Quanto ai *confetti* l'esame microscopico è specialmente diretto a ricercare i frutti che sono stati adoperati nella loro fabbricazione. Sarebbe però troppo lungo qui il riportare i particolari microscopici su cui fondarsi per giungere alle diagnosi singole. Nel trattato del Vallin si trovano descrizioni e figure che possono permettere di orientarsi.

ESAME MICROSCOPICO DELLE DROGHE E DELLE SPEZIE.

Si chiamano *droghe* e *spezie* quei derivati da cortecce, fiori, frutti, radici, ecc., di piante esotiche, che servono in gastronomia come condimenti, ed entrano nella confezione di molte sostanze destinate all'alimentazione.

Per praticarne l'esame quand'esse sono polverate, se ne versano 4-5 gr. in acqua distillata e si esamina un po' del materiale in glicerina a 250 diametri. Così si può concludere per la presenza o l'assenza di prodotti feculenti oltre quelli che sono contenuti nelle specie di spezie. Aggiungendo una goccia di soluzione iodoiodurata, nel caso si sospetti la presenza di amidi eterogenei, si potrà apprezzare approssimativamente l'importanza delle mescolanze.

Ciò fatto si fa bollire in una capsula di porcellana per 4-5 minuti, in acqua alcalinizzata all'1 % una certa quantità di polvere. Si lascia raffreddare, depositare, e si decanta sostituendo al decantato acqua distillata e ciò fino a limpidezza. Si decanta un'ultima volta e poi si raccoglie la massima parte del deposito polverulento e lo si distende sopra un piatto di porcellana. Si toccano con l'ago vari punti per giudicare della resistenza degli elementi della polvere e si guarda con una lente per vedere se ci siano elementi papiracei, mucilagginosi, fibrosi o filamentosi.

Si prelevano quindi ed esaminano gli elementi colorati al microscopio e poi gli altri.

Faccio notare che si è anche cercato di applicare la diagnosi delle varie specie di droghe a mezzo della siero-reazione sieroprecipitante. Il Lupini avrebbe trovato che la formazione delle sieroprecipitine è tanto più facile e tanto più abbondante quanto è maggiore il contenuto in amido e in albuminoidi delle sostanze.

Le ricerche però sono all'inizio ed ancora nel campo farmacologico.

Tra le principali droghe e spezie vanno citati il *pepe*, lo *zafferano*, la *cannella*, i *garofani*, le *noci moscate*.

Pepe.

Il pepe è la bacca disseccata del *Piper nigrum*, e si trova in commercio tal quale, oppure macinata sotto forma di polvere di pepe. Questa può essere scura o *nera*, come si dice, se la bacca viene triturata tal quale, *bianca* se è stata prima macerata nell'acqua salata o di calce per decorticarla.

Il pepe viene anzitutto *falsificato in grani*. A tal uopo si ricorre ad impasti di farine diverse insieme a un po' di polvere di pepe. Si riconoscono però facilmente i grani artificiali, gettandoli in un bicchiere a calice pieno d'acqua, dove essi vanno a fondo e dopo un certo tempo si disgregano, mentre il vero pepe galleggia, salvo la specie pesante del Malabar e i vecchi grani di pepe bianco (Bertarelli) i quali vanno a fondo ma non si disgregano. Si possono in questi casi usare delle miscele di acqua e glicerina (densità 1,080-1,110) nelle quali i grani di pepe bianco galleggiano, mentre quelli di pepe artificiale cadono al fondo (Bertarelli). È utile nei casi dubbi far bollire a lungo in un recipiente chiuso i granuli: se sono di pepe falsificato, è facile vederli già spappolati nell'acqua; se di pepe vero si rigonfiano soltanto. Chi abbia un autoclave può fare la prova mettendoveli dentro per un'ora: prendendo dopo un granello di pepe falso fra il pollice e l'indice e comprimendolo, si spappolerà senz'altro, mentre prendendone uno di pepe vero si spaccherà semplicemente.

Naturalmente l'esame microscopico del materiale assoda la diagnosi.

Se *si tratta di vero pepe* si devono trovare i seguenti elementi:

nel *pepe nero* (figura 245), molte cellule sclerosate a pareti spesse con fessure dall'interno all'esterno della parete, ammassi di cellule poligonali a pareti esili, framenti di fasci, fibre ravvolte a spira, trachee, cellule quadrangolari a pareti spesse, addossate a elementi cellulari brunastri, cellule contenenti goccioline di olio, altre poligonali o d'altra forma, contenenti fini granuli amilacei che possono trovarsi anche liberi;



Fig. 245.

nel *pepe bianco* (siccome deriva dai granuli decorticati) mancanza,

almeno in quasi tutte le qualità, delle cellute sclerosate allungate a pareti canalicolate, minor numero di fasci fibrolegnosi anzi qualche volta presenza di sole trachee, e nel restante gli stessi elementi del pepe nero.

Se invece *non si tratta di vero pepe*, potranno trovarsi gli elementi più diversi, perchè innumerevoli sono le falsificazioni e le adulterazioni che si fanno di questa droga.

Sono stati trovati grani formati di amido di mais, di frumento, di noccioli di oliva, peperoni di Spagna e gomma (Bertarelli), di frumento, lignina (1), polveri di peperoni (così si fanno le così dette coccole insetticide), di frumento e lignina (Grimaldi), di frumento, cascame di pepe, destrina e polvere di carbone, di farina di frumento avariata, mondiglia di pepe, polveri di nocciole di olive, frammenti di peperone di Spagna, destrina e polvere di carbone (Barbagallo). Il materiale più comune col quale si fanno i grani artificiali è fornito dalla polvere dei peduncoli, dei ramoscelli, del rivestimento del seme. Questa polvere è ricchissima di fasci fibrolegnosi, di trachee, di fibre pericicliche o a spirale, e non contiene i caratteristici elementi sclerosati del pepe, le cellule oleifere ed amilifere. Essa quindi sarebbe facilmente riconoscibile al microscopio; ma per lo più viene mescolata a terra e ad altri materiali per cui diventa a sua volta pressochè inidentificabile.

Questo stesso materiale è quello che viene più frequente mescolato alla polvere di pepe per adulterarla. Si adoperano però anche:

la polvere di *noccioli di olive*, che è facile riconoscere per le lunghe fibre fusiformi incolori non fenestrate e per il gran numero degli elementi sclerosati a parete fessurata che hanno un contenuto incolore, mentre quello del pepe è brunastro, e la parete di una tinta verdastra, mentre quella del pepe è gialliccia;

amidi e *fecole* insieme agli elementi della crusca o della buccia, i quali tutti sono più o meno prestamente diagnosticabili tenendo presenti i caratteri già addotti nell'esame delle farine;

la polvere di *ghiande*, che si riconosce dai granuli di amido di forma irregolarmente allungata od ovale a contorni irregolari, con ilo a lente biconvessa, i quali si accompagnano a elementi cellulari parenchimatosi (di cui alcuni contengono ancora dei granuli di amido) disposti in lembi più o meno grandi;

la *segatura di legno*, che si rivela per il gran numero di elementi legnosi, ecc.;

la polvere di *scorza di nocciole*, che è ricchissima di cellule sclerosate assai simili a quelle dei semi di olive e quindi differenti da quelle del pepe stesso;

le *polveri minerali*, variabili per provenienza, amorfe per lo più, generalmente stridenti sotto il vetrino, precipitanti al fondo di un bic-

(1) La lignina, o legnoso, consiste di polvere di noccioli di olive, di dattero, di palma, di mandorle, di noce, di nocciole, e si chiama, nel caso del pepe, pepina o pepolina.

chiere a calice contenente acqua, assai più rapidamente di tutti gli altri elementi del pepe puro o adulterato;

I granuli di polline di diversi vegetali facili a riconoscersi se si fa una preparazione nel liquido di Gnequen (acido lattico + bleu di coton) di cui si è parlato nell'esame delle farine, perchè i granuli di polline risultano di bel colorito bleu con i loro particolari caratteri.

Nella pratica per diagnosticare di quale sofisticazione si tratta, secondo il Collin e il Villier, l'osservatore comincierà anzitutto con l'esaminare una polvere di pepe dopo averla fatta macerare per circa dodici ore in una soluzione acquosa di cloralio all'8%. Quando, in seguito alla osservazione di cinque o sei preparati, si sarà reso conto della relativa proporzione dei diversi elementi del pepe in esame, allora solo si procederà all'esame del pepe sospetto previamente sottoposto alla suddetta macerazione.

1. *Verificando nella polvere sospetta un eccesso di amido*, se questo amido è più piccolo di quello del pepe, se è racchiuso in cellule fusiformi, e se a lato di queste cellule si rinvengono delle cellule epispermiche brune, fusiformi, a pareti spesse ed incurvate, delle cellule sclerose, brune, a lume puntiforme e delle cellule trasversali regolari, si concluderà per la presenza di *cardamomo*.

Se l'amido è in piccoli grani chiusi entro cellule poligonali allungate, se vicino a queste cellule si osservano delle cellule epispermiche a parete molto sinuosa e dei detriti di tegumenti con delle lacune tondeggianti, vuol dire che c'è del *grano saraceno* o *frumento nero*.

Se l'amido è in grani molto voluminosi o striati concentricamente e se questi grani sono accompagnati da larghe cellule epidermiche a parete sottile e da trachee ben sviluppate e da vasi molto larghi, nella polvere ci saranno o *residui della preparazione della fecola di patate* o delle *spezie di Alvernia*.

Se l'amido è in grani ovoidali molto grossi ed accompagnati da cellule sclerose, a parete spessa e dentellata a guisa di sega, vi sarà aggiunto del *miglio* o dell'*orzo*.

Se l'amido si presenta in grossi grani striati concentricamente e parallelamente, sotto forma di pera allungata o di bottiglia, e accompagnati da fibre, da grossi vasi raggianti e da cellule resinose, si sospetterà la presenza dei *rizomi di galanga*.

2. *Verificando la presenza di numerose cellule sclerenchimatose prive di materia brunastra*, se queste cellule sono molto irregolari nella loro forma e se sono tutte munite di pareti molto spesse e canalicolate, si potrà sospettare l'aggiunta di *sansa di olive*.

Se queste cellule sono un poco più regolari e se qualcuna di esse è provvista di pareti assai meno spesse e punteggiate, sarà indizio della presenza di *gusci di noce*.

Se queste cellule sono a pareti spesse e raggiate, se hanno dimensioni ineguali e se le cellule epidermiche sono munite di peli marginali conici, corti ed unicellulari, vi sarà ragione di sospettare la presenza di *gusci di nocciuole*.

3. *Verificando la presenza di numerose goccioline di olio entro cellule poligonali irregolari e di detriti colorati di episperma*, se questi ultimi sono ricoperti da una rete a maglie esagonali, se presentano una tinta brunoscura, si concluderà per la presenza di *mostarda nera*.

Se invece sono colorati in giallo-pallido, se sono regolari ed accompagnati da cellule poligonali più piccole, a pareti rifrangenti, piene di corpuscoli, vi sarà stata aggiunta della *mostarda bianca*.

Se vi sono detriti bruni, con strie molto larghe e sinuose, si tratterà di *sansa di arachidi o pistacchi di terra*.

Se sono colorati in bruno cupo e accompagnati da cellule fusiformi ricoperte da un lato con cellule rotondeggianti e dall'altro con cellule trasversali, regolari, vi sarà aggiunta della *sansa di lino*.

Se sono rotondi, finamente striati e accompagnati da grosse cellule parenchimatose a pareti molto spesse e sinuose, vi sarà aggiunta invece della *sansa di canapa*.

4. *Verificando la presenza di gruppi di cellule regolari e punteggiate* che delimitano degli stomi disposti irregolarmente, delle cellule a palizzata e alcune cellule sclerose a pareti mediocremente spesse, vi saranno aggiunte *foglie di lauro*.

5. *Verificando la presenza di grosse ghiandole otricolari e di piccole ghiandole unicellulari* sopra dei frammenti di epiderma, muniti di stomi, disposti perpendicolarmente al tramezzo che separa due cellule vicine, si rivelerà la esistenza delle *sommità fiorite di labiate* (*timo*, *pepolino*, ecc.).

6. *Verificando la presenza di grosse cellule sclerenchimatose e bernoccolute, a pareti molto spesse e sinuose*, accompagnate da cellule contenenti una materia colorante rossa e da cellule sclerose a pareti più sottili e sinuose, si concluderà per l'aggiunta di *pepe di Cajenna*.

7. *Verificando la presenza di numerose cellule sclerose intrecciate in vario senso*, di cellule ispessite e contenenti dei granuli di aleurone e dei cristalli a rosetta, si rivelerà l'aggiunta di *polvere di coriandolo*.

8. *Verificando l'abbondanza di detriti fortemente colorati*, di fibre molto spesse, di cellule sclerose molto larghe, a pareti punteggiate e poco spesse, separate da grandi meati e la presenza di lunghi peli marginali conici, uniseriati e pluricellulari, sarà permesso di sospettare l'aggiunta di *frantumi residuali di pepe*.

9. *L'abbondanza di cellule epidermiche, di fibre spesse e di cristalli semplici od agglomerati* rivelerà l'esistenza probabile di una *polvere di scorze diverse*.

Zafferano.

Lo zafferano genuino (stimmi del *Crocus sativus*, pianticella bulbosa della famiglia delle Iridacee) ha un prezzo molto elevato e per tale ragione è continuamente oggetto delle più diverse frodi, e queste frodi sono più frequenti e meno facili a scoprirsi nello zafferano che viene posto in vendita polverizzato.

Le frodi consistono, il più sovente, nell'aggiunta di polveri minerali o di polveri vegetali che posseggono un colorito simile a quello della polvere di zafferano, e nell'aggiunta di sostanze colorate artificialmente e previamente spalmate di olio, glicerina, miele, ecc.

Il microscopio e qualche semplice reazione chimica caratteristica, sono i presidî necessari per il suo accertamento.

Gli elementi di una polvere di zafferano genuino (fig. 246) sono caratterizzati da protuberanze molto bene appariscenti sulle cellule epidermiche che sono sensibilmente rettangolari o leggermente poligonali; da papille numerose nella parte superiore degli stimmi; da un grande nu-

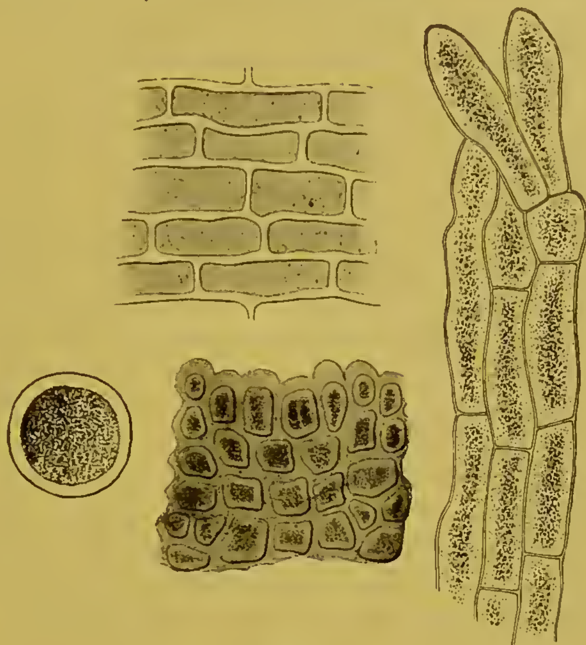


Fig. 246.

mero di trachee molto fine ed orlate di cellule fusiformi; da granuli di polline di forma arrotondata e di aspetto liscio.

Un mezzo rapido per svelare la frode nello zafferano polverizzato, consiste nel prenderne una piccola quantità e distesala su di un vetrino portoggetti, versarci sopra una goccia di acido solforico concentrato. Coperto allora il materiale con un vetrino coproggetti, si guarda subito il preparato a debole ingrandimento. I frammenti di zafferano puro si vedranno di un colore azzurro-cupo che passa al violaceo e circondati da una zona liquida dello stesso colore.

Bisogna essere rapidi nella prova, perchè la tinta bleu-violacea prodotta dal contatto dell'acido solforico con lo zafferano è molto instabile.

Si può anche agire meglio come segue: si mette a fuoco il preparato e tenendo l'occhio all'oculare, si depone una goccia di acido solforico su uno dei lati del coproggetti, in modo che l'acido si insinui tra i due vetrini. Si notano così le modificazioni di colore che assume la polvere appena viene investita dall'acido: se appare subito una colorazione viola intensa, vuol dire che la polvere contiene orange-β-naftolo; se si ha colore azzurro che poi passa al verde e al bruno vi è dello zaffranone (*Carthamus tinctoria*).

Le polveri vegetali che si aggiungono a scopo di frode sono la *polvere di radice di curcuma* (*Curcuma longa*), facile a mettersi in evidenza per la

colorazione azzurra che, a contatto con una goccia di liquido di Lugol, assumono i frammenti più o meno voluminosi formati da cellule molto larghe, irregolari e ripiene di salda d'amido. Insieme poi alle cellule amilacee si osservano al microscopio delle cellule più piccole che contengono una materia resinosa di un bel giallo d'oro e dei vasi striati e limitati da cellule fusiformi a pareti piuttosto spesse. Si notano ancora dei granelli di fecola appiattiti, ellittici od ovoidi spesso prolungati, ad una delle loro estremità, in una breve punta smussata e talora anche troncati: presso la estremità affilata si scorge l'ilo e generalmente si distinguono nel granello degli strati concentrici.

La *polvere di legno di sandalo rosso* (*Pterocarpus santalinus*) si rivela dall'esame microscopico che mette in evidenza le fibre legnose, munite di pareti molto spesse e che conservano il loro colorito rosso anche se trattate con glicerina acetica: oltre a queste si nota l'esistenza di frammenti di vasi legnosi molto larghi e regolarmente punteggiati, di cellule punteggiate provenienti dal parenchima legnoso e la presenza di un grande numero di cristalli prismatici di ossalato di calce, racchiusi entro piccole cellule sovrapposte e aderenti alle fibre legnose. Nelle cellule e nei vasi si possono talora riscontrare dei piccoli granuli e delle goccioline di una materia colorante di un intenso e magnifico rosso (*santalina*), che vi si trova nelle proporzioni di circa il 16 %. L'alcool le discioglie immediatamente e il liquido diventa rosso; la potassa caustica del pari le discioglie, assumendo un colore violetto e colorando nel tempo stesso in violetto le pareti cellulari.

La *polvere di legno di fernambuco* (*Caesalpinia crista*), albero delle foreste del Brasile e della Giamaica, molto ricco di una sostanza colorante rossa facilmente solubile nell'acqua, è caratterizzata dalla presenza di grossi vasi screziati, di fibre legnose più o meno frammentate, sia isolate che riunite in fasci, da detriti di parenchima legnoso formato da cellule lunghe a pareti spesse e punteggiate, da raggi midollari isolati o aderenti a dei frammenti più o meno voluminosi di segatura. Qualche volta si possono ritrovare anche qui dei cristalli prismatici di ossalato di calce nelle cellule aderenti alle fibre.

La *polvere di legno di campeggio* si riconosce facilmente perchè colora la saliva in rosso scuro ed ha un sapore astringente zuccherino.

La *polvere dei fioretti di cartamo* presenta al microscopio i seguenti caratteri: cellule irregolarmente poligonali più lunghe che larghe; piccole papille arrotondate molto meno appariscenti e meno grosse di quelle che si osservano sugli stimmi dello zafferano. Le cellule epidermiche della corolla contengono granelli di una materia colorante rossa e di un'altra gialla. Si notano ancora frammenti di piccoli fasci fibro-vascolari, cellule quadrangolari o leggermente arrotondate, trachee sottili, ed infine granuli di polline che sono molto più piccoli di quelli dello zafferano, a superficie verrucosa con tre angoli arrotondati provvisti di tre pori molto evidenti.

La *polvere dei semi-fioretti del fiorrancio* è caratterizzata da cellule dell'epidermide della corolla, molto strette, allungate, rettangolari o leggermente poligonali e contenenti una sostanza colorante di un bel giallo aranciato in forma di goccioline piuttosto grosse ed ovali; si osservano ancora dei peli, uniseriati o biseriati e pluricellulari, conici. Questi peli possono essere corti e composti di due cellule poligonali che si fanno via via più piccole a mi-

sura che si allontanano dalla base del pelo che è molto larga. Qualche volta questi peli sono pluriseriati per i tre quarti inferiori della loro lunghezza e uniseriati nella loro parte superiore. Esaminando poi minutamente al microscopio la polvere dei semi-fioretti del fiorrancio si scorgono qua e là del granuli di polline che non sono a superficie liscia come quelli dello zafferano, ma irti di piccole punte coniche, notevolmente più piccoli di quelli del cartamo, di forma pressochè triangolare e muniti anche essi di tre pori bene evidenti.

La *polvere dei fiori di melagrano* è riconoscibile al microscopio, perchè la corolla dei fiori di melagrano è ricoperta di una epidermide formata da cellule irregolari a pareti ondulate e rivestite da una cuticola nettamente striata. Nella parte superiore della corolla le cellule epidermiche assumono la forma di papille molto prominenti; nella parte inferiore esse sono allungate ed ugualmente striate. I granuli del polline sono ovoidali o triangolari ed il parenchima compreso fra le epidermidi della corolla contiene dei cristalli stellati di ossalato di calce.

La *polvere dei fiori di arnica* è facilmente riconoscibile per la quantità e varietà dei peli che aderiscono alla corolla, unicellulari, pluricellulari, uniseriati, conici e variamente accoppiati e disposti a forma di un ciuffo di penne, del tutto caratteristico. Si notano ancora delle cellule epidermiche della corolla, della porzione filamentosa del fiore, alcune disposte a forma di papilla, altre irregolarmente poligonali, allungate e striate. I granuli di polline sono irti di papille molto appariscenti e sono più piccoli di quelli dello zafferano.

È stata anche rilevata nella polvere di zafferano la presenza di frammenti finissimi delle *tuniche di cipolla* disseccate e colorate artificialmente e la presenza di polvere di *peperone rosso, fecole, destrina, carne, gesso, creta, sabbia, borace, solfato di soda e di bario, cloruro di sodio, nitrato di potassa, cremor di tartaro, tartrato di bario e di potassio* (crema di tartaro solubile), *limatura di piombo e polvere di smeriglio;* tutte sostanze che vengono spalmate di olio, di glicerina o di miele e quindi colorate artificialmente e profumate con la tintura di zafferano.

La sofisticazione dello zafferano in polvere è giunta fino al punto di far passare per zafferano una polvere costituita essenzialmente di *giallo Vittoria.*

Esso infine può venire messo in commercio dopo essere stato spogliato in tutto od in parte della sua materia colorante mediante uno speciale trattamento con alcool. Questa polvere di zafferano esausto si riconosce facilmente: essa ha poco o punto odore; il suo colorito ha perduto di intensità, è di un rosso pallido, talvolta quasi giallo; tinge appena la saliva in giallo; messa a contatto con l'acqua la colora debolmente. Naturalmente queste differenze sono meglio apprezzabili quando si fa una esperienza comparativa con dello zafferano di buona qualità (1).

(1) Ho tratto tutto il capitolo sullo zafferano da una rivista sintetica sulle sofisticazioni dello zafferano in polvere e sui mezzi per renderle evidenti, compilata dal dott. A. Bajardi: lo stesso si dica di ciò che si riferisce alle adulterazioni del pepe polverato.

Cannella.

La cannella è la corteccia di diversi alberi del genere *Cinnamomum*. In commercio se ne distinguono generalmente due specie, quella di Ceylan e quella di Cina, di cui la prima è più apprezzata. Si vende in cannelli o scorze arrotolate su sè stesse, ed in polvere.

Gli *elementi della cannella di Ceylan* (fig. 247, *a-b*) sono rappresentati da cellule fusiformi molto lunghe, a pareti spesse, fessurate longitudi-

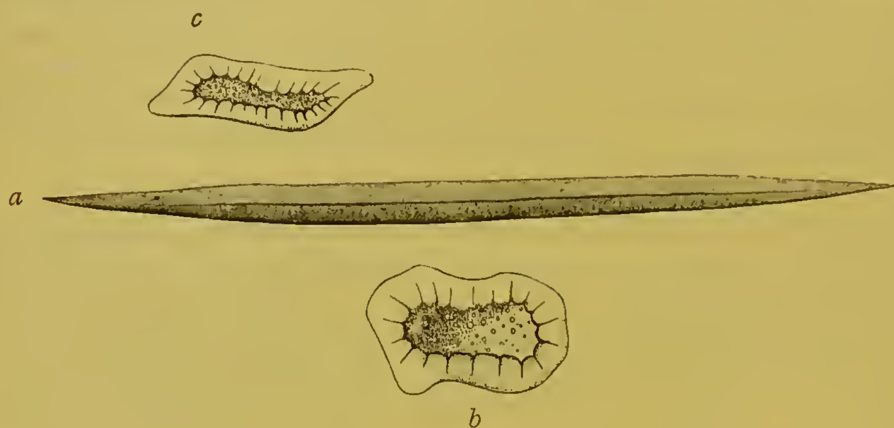


Fig. 247.

nalmente, da cellule sclerosate, allungate, rotondeggianti, a pareti spesse, con fessure nella membrana dall'interno verso l'esterno e a contenuto giallo; da cellule amidifere, con granuli di amido piccolissimi, ed oleifere contenenti anche cristalli di ossalato di calce.

Gli *elementi della cannella di Cina* sono gli stessi della cannella di Ceylan (fig. 247, *a-c*); però le cellule sclerosate sono più larghe e tendono alla forma quadrangolare, le cellule amidifere sono più numerose; i granuli di amido più grandi ed in essi è visibile un ilo. Di più vi sono cellule suberificate che si presentano come elementi a membrana spessa, a contenuto bruno, a contenente resinoso, generalmente disposte a strati, nei frustoli.

La *sostituzione che si fa alla cannella in scorza* consiste nel vendere per cannella di Cina o di Ceylan cannelle ancora più scadenti. In tal caso l'esame microscopico può ben poco, tutt'al più si riesce a conoscere la sostituzione della cannella di Ceylan con altre cannelle, come con quella di Cina.

Le *adulterazioni più comuni della polvere di cannella* consistono nel mescolare alla stessa la polvere di nocciole, di scorza di noce, di mandorle, ossia elementi facilmente riconoscibili per il gran numero di cellule sclerosate che contengono, le quali sono poi del tutto incolori, mentre quelle della cannella sono giallastre. La cannella, come il pepe, viene anche adulterata con polveri minerali, ed esse si riconoscono nella stessa maniera.

La *cannella sia in scorza che in polvere* si vende subdolamente molto spesso *spossata*, ossia precedentemente esaurita coll'alcool o col vapor d'acqua per estrarne l'essenza. Al microscopio si sospetta la frode per la chiarezza degli elementi, per la mancanza o quasi di gocciole oleose e per la scarsezza delle cellule oleifere.

Questa cannella polverizzata spossata viene poi a sua volta aggiunta a cannella non spossata: in tal caso riconoscere la frode diventa impossibile mediante il semplice esame microscopico.

Garofani.

I garofani sono i bottoni floreali del *Caryophyllus aromaticus*. In commercio si trovano quelli inglesi, che sono più apprezzati, e quelli di Borbone e di Cajenna: questi ultimi sono i più scadenti. Generalmente i garofani si vendono intatti col nome di *chiodi di garofani*, ma possono trovarsi anche sotto forma di polvere.

I *chiodi* vengono frequentemente venduti già spossati, ossia esauriti con alcool o vapor d'acqua per estrarne l'olio essenziale; più raramente

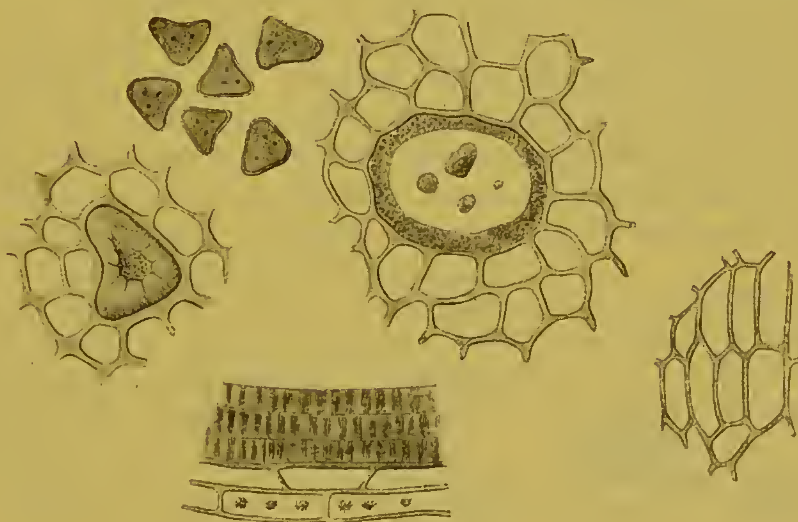


Fig. 248

sostituiti addirittura con impasti di farine, cui si dà la forma del chiodo, i quali impasti si rendono odorosi aggiungendovi un po' di olio essenziale.

Per riconoscere tali frodi si triturano e si esaminano al microscopio. Già durante la triturazione, se sono stati spossati, si frammentano abbastanza facilmente, mentre se non sono stati spossati, i frammenti si rompono meno facilmente e si attaccano al pestello e alle pareti del mortaio. L'esame microscopico completa poi la diagnosi.

Se si tratta di chiodi di garofani veri (fig. 248), si troveranno delle cellule epidermoidali isolate o addossate a glandole ad olio essenziale;

lunghe fibre fusiformi, cellule contenenti cristalli di ossalato di calce, grani di polline triangolari e forniti di tre pori, fasci fibrolegnosi, gocciole di olio.

Se si tratta di chiodi di garofani spossati, si troveranno gli stessi elementi, ma scarse o assenti saranno le gocciole di olio, ben visibili le ghiandole oleifere e coi loro elementi chiarissimi, ecc.

Se si tratta di chiodi di garofani artificiali, si opera nel modo indicato per riconoscere i grani di pepe artificiali.

In quanto alla *polvere di garofani* è così poco comperata che non vale la pena di parlarne: essa ad ogni modo può venire adulterata con polvere di chiodi di garofani spossati o di qualità inferiore, con quella dei più diversi semi, con polveri minerali. La sofisticazione più comune consiste nell'aggiungere la polvere dei pedicelli floreali della stessa pianta: essa si riconosce facilmente all'esame microscopico per la presenza di gran numero di lunghe fibre a pareti spesse, di cellule sclerosate, ecc.

Noce moscata.

La noce moscata è il grano della *Myristica fragrans*, la quale si vende per lo più in grani, raramente sotto forma di polvere.

Le *noci intiere* possono essere sostituite con noci artificiali che si riconoscono nello stesso modo dei grani di pepe e di garofani artificiali. Si vendono anche in parte sostituite, quando, per una causa qualunque, per es. per opera di insetti, manca qualche pezzetto al nocciolo: e tale sostituzione parziale si fa con pasta di farina. Essa si riconosce dopo la macerazione in acqua. Sono anche fraudolentemente messe in commercio spossate, cioè private del grasso, il così detto burro della noce moscata: però più che coll'esame microscopico, questa frode si diagnostica con mezzi chimici. Il microscopio non fa che sospettarla per mancanza del grasso o scarsezza dello stesso.

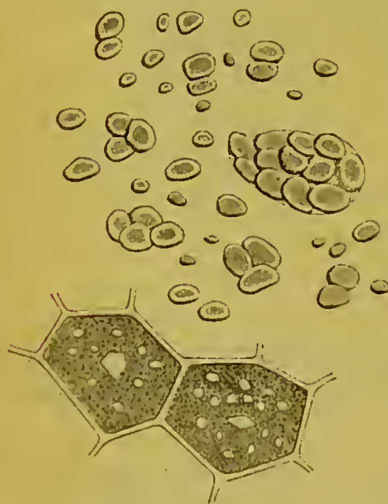


Fig. 249.

Sotto forma di polvere la noce moscata si adultera con gli stessi elementi coi quali si adulterano le altre droghe. Le frodi si riconoscono cercando gli elementi caratteristici della noce moscata, e vedendo se non ve ne siano altri che non sono proprî di essa.

Gli elementi caratteristici della noce moscata (fig. 249) sono i seguenti: cellule poliedriche appiattite a pareti finemente colorate in bruno, contenenti anche cristalli di materia grassa; cellule parenchimatose poliedriche e pareti sottili, contenenti amido; cellule a pareti sottili bruna-

stre o granulose contenenti materia grassa, la quale fuoriesce facilmente nelle preparazioni, maschera le altre parti della polvere e si presenta in masse giallastre amorfe ed anche in cristalli.

ESAME MICROSCOPICO DELLE MOSTARDE E DELLE CONSERVE DI VERDURE.

Mostarda.

Si sa che le *mostarde* sono fabbricate con i semi di alcune brassiche e della *sinapis alba* i quali vengono tritati sotto un filo di un liquido di diversa composizione (aceto diluito, salato, aromatizzato, aggiunto di acido acetico o di tannino, vino bianco, mosto di uva), ottenendosi un pastone che si costringe ad attraversare speciali setacci.

Per l'esame microscopico delle mostarde, si lava una piccola porzione del campione da esaminare, se ne prelevano diverse quantità della grandezza di un grano di miglio, ciascuna delle quali si stende sopra un vetro: vi si versano copra 1-2 goccie di soluzione iodo-iodurata al 2.5 %, si copre con coprioggetti, e si schiaccia leggermente. Si deve vedere una massa biancastra al centro limitata alla periferia da un anello giallo. Sollevando il vetrino coprioggetti tutta la massa deve assumere una tinta giallastra, a meno che non si tratti di mostarda non setacciata perchè allora si osserveranno delle punteggiature nella preparazione. A controllo si ripete l'operazione con mostarda contenente l'1 % di amido di riso. In tale caso l'orlo periferico assumerà una tinta leggermente grigiastra. Si passa allora ad esaminare al microscopio le due preparazioni e si osserveranno le nette differenze tra l'amido normale della mostarda e quello del riso.

L'amido di mostarda si presenta in grani di dimensione svariata di 1.5-2 μ i più piccoli, di 1.10 μ i medî, di 20 μ i più grandi; sono raramente poliedrici: più spesso ovali, deformati in diversi punti, mai composti, pur potendosi osservare in gruppi, assai differenti però da quelli del riso, avena e grano saraceno.

L'unico amido che possa avere con quello della mostarda somiglianza, è quello di riso: è facile però differenziarlo per i suoi granuli angolosi, poliedrici e per i suoi granuli composti.

Le falsificazioni delle mostarde si fanno, oltre che servendosi di gran numero di semi di altre crocifere, falsificazioni che non sono troppo facili a mettersi in evidenza, con i seguenti materiali:

1° sostanze amilacee estranee, provenienti da frutti di graminacee, di leguminose, di ombrellifere;

2° aggiunta di curcuma, per dare un bel colore;

3° una serie di altre sostanze, come la sansa del colza, la polpa del grano.

In tutti questi casi l'esame microscopico, unito al dosaggio dell'essenza della mostarda, rivela la frode.

Nella pratica ordinaria microscopica basterà procedere alla ricerca dei granuli di amido, i quali nella mostarda esistono sempre coi caratteri sopraricordati e mai in quantità molto rilevante.

Va notato che la mostarda bianca, la comune senape alimentare, indipendentemente dalle falsificazioni, può andare soggetta a delle alterazioni che le dànno un sapore sgradevole di rancido. In queste senape sono stati riscontrati dei germi: il *B. sinapivorax di Kasswicz* e il *B. sinapiragus*.

Recentemente Bertarelli e Marchelli hanno isolato da una mostarda diafana un germe il quale fu da loro identificato col *Proteus Zenckeri*.

Per la diagnosi di queste forme l'esame microscopico bisogna però che sia coadiuvato dall'esame batteriologico.

Conserva di pomodoro.

Fra le varie salse commerciali, si trovano alcune conserve, la più comune delle quali è quella di *pomodoro* preparata dal succo — mesocarpo — del *Solanum lycopersicum* per fermentazione, per cottura e disseccazione.

L'esame microscopico di essa, *quando si tratta di conserva ben fatta*, in cui non entra che il solo mesocarpo, fa vedere grandi cellule ovali o



Fig. 250.

rotondeggianti (fig. 250) (nelle quali si osserva qualche grano di amido e degli ammassi amorfi di sostanza colorante) e dei fasci fibrolegnosi.

Quando invece trattasi di conserva mal lavorata, si trovano anche elementi dello spermoderma, quindi cellule irregolari a pareti spesse, liscie o punteggiate, con pigmento di tinta variabile e i residui dei sepimenti formati da grandi cellule irregolari a pareti un po' ispessite, ondulate e persino sinuose.

Nell'esame microcopico della conserva di pomodoro è essenzialmente necessario ricercare la presenza del mesocarpo, e siccome le pareti cellulari possono essere distrutte o rotte, la dimostrazione del medesimo è legata alla presenza del pigmento e dell'amido che in esse si conteneva.

Il *pigmento* si presenta sotto tre forme: di piccole lamelle poligonali, di bastoncini sottili, di aghi terminanti con una estremità aguzza e con l'altra tronca. Questo pigmento non va confuso con quello dell'epicarpo: per distinguerlo, basta trattarlo sotto al campo microscopico con una goccia di acido solforico; il suo colorito deve passare immediatamente al bleu-indigo.

In quanto ai granuli di amido, i più debbono essere grandi μ 6-16, altri appena μ 2 e altri sino a 35.

I granuli di grandezza media nella conserva normale, non dovrebbero trovarsi per ogni campo microscopico, all'ingrandimento di 300 D, in numero magggiore di 2 ad 8.

Di più i granuli grandi, all'esame polariscopico, si presentano attivi in campo oscuro e mostrano una nitida croce nera incastrata in una croce chiara, assai più ampia, di sostanza attiva alla luce polarizzata; i granuli piccoli sono invece brillanti in totalità in campo scuro.

La conserva di pomodoro è stata trovata adulterata per l'aggiunta di polpa di zucca o di carota, dei frutti della rosa selvatica, nonchè di amidi di diversi cereali o di fecole.

La *polpa di zucca* (fig. 251) si riconosce per la presenza di grandi e numerosi fasci fibrovascolari; le trachee sono grandi, accompagnate quasi sempre da vasi raggiati nonchè da cellule speciali allungate, tubulari, che sembrano dei vasi latticiferi. Se vi sono elementi dell'epi-

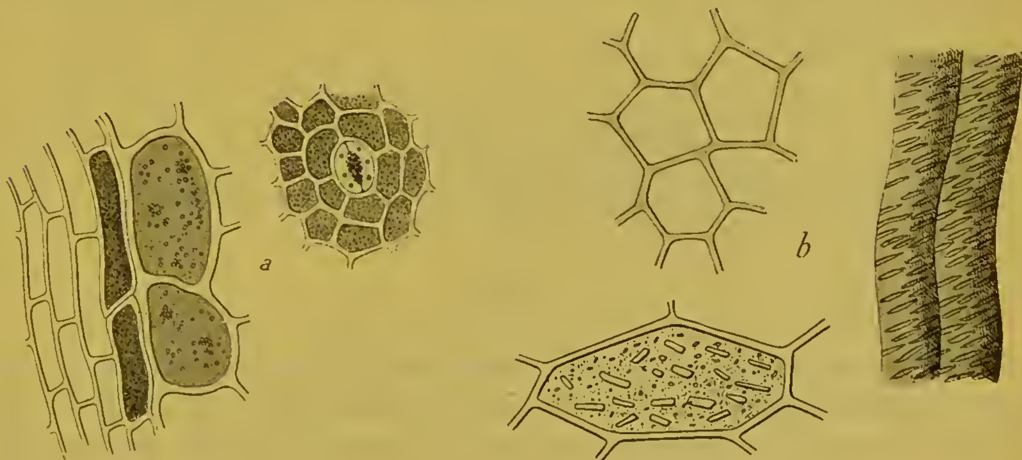


Fig. 251. Fig. 252.

carpo, sono rappresentati da cellule di forma variabile, e cuticola spessa, liscia, e fra di essi si notano degli stomi.

La *polpa di carota* (fig. 252) ha qui caratteri molto più netti di quando si osserva nella polvere di caffè dove si trova polverizzata e secca.

Fanno parte della polpa della carota cellule epidermiche allungate a pareti sottilissime; cellule irregolarmente poligonali contenenti materia colorante cristallizzata o no in modo caratteristico e disposta

molto diversamente da quella del pomodoro; grandi elementi tracheali; fasci fibrovascolari, in genere diritti, con punteggiature e raggi particolari.

I *frutti della rosa selvatica* (canina) impartiscono alla conserva un sapore ed un colorito che non si allontana gran che da quello del pomodoro. Tale adulterazione è stata scoperta di recente (Baldoni) e la sua presenza, a parte i particolari microscopici degli elementi di questo frutto, si riconosce perchè il contenuto di alcune cellule (quelle immediatamente sottostanti allo strato epidermoidale) in presenza di qualche goccia di percloruro di ferro al ½ %, assume una colorazione verde-scura dovuta al tannino che contengono; nessun elemento della conserva di pomodoro dà questa reazione, non contenendo tannino.

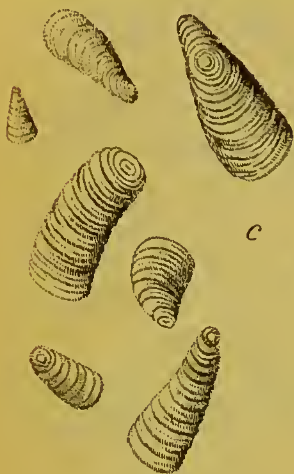


Fig. 253.

L'*amido*, col quale più facilmente si sofistica la conserva di pomodoro, è quello di granturco, che si riconosce per i suoi caratteri già indicati nell'esame delle farine: si può però trovare anche la *fecola di dioscorea* (fig. 253), che si riconosce per la presenza di granuli di amido ondeggianti od ovoidali o ellittici o allungati e alquanto incurvati, con una striatura evidentissima, un ilo eccentrico o puntiforme o crociato o stellato o a fessura, grandi μ 30-80-100, attivi alla luce polarizzata, ecc.

ESAME MICROSCOPICO DEL VINO, DELL'ACETO E DELLA BIRRA.

Vino.

L'esame microscopico del vino può dirsi tale nello stretto senso della parola soltanto finchè serve alla ricerca della natura dei depositi del vino e in parte per quello degli agenti delle malattie del vino stesso.

1. Esame per riconoscere la natura del deposito. — Nel vino distinguonsi quattro sorta di depositi: l'uno formato da cristalli, l'altro da polveri, il terzo da sostanze coloranti, il quarto da microrganismi.

I *cristalli* che possono trovarsi nel vino sono di due sorta: cristalli di bitartrato potassico, che si posano nei punti più declivi dei vasi in ammassi per lo più raggiati e bene spesso fioccosi; cristalli di tartrato neutro di calcio, rappresentati da grandi prismi sovente a facce emiedriche, i quali in parte formano la così detta camicia che riveste le pareti delle bottiglie.

Le *sostanze polverose* sono dovute generalmente a terra, che viene portata insieme all'uva e che si riconosce per i suoi granuli amorfi, irregolari, che si depositano rapidamente al fondo del recipiente e la cui presenza si sospetta sin da principio per il così detto odore di terra che ha il vino.

Il *deposito dei microrganismi* è raro: però si può trovare qualche cellula blastomicetica e qalche germe proveniente dall'uva. Se abbondano i *saccaromiceti*, il vino ha un sapore frizzante ed è in parte guasto. Se abbonda il *Dematium pullulans* (che ha tutti i caratteri di un oidio), il vino ha odore sgradevole; se evvi la *Botritis cinerea*, od esso proviene da uve che siano state attaccate dalla stessa (uve marcite), il vino è liquoroso e torbido, imbrunito o decolorato.

2. Esame microscopico per riconoscere se il vino sia alterato da microrganismi. — Il vino può essere soggetto a malattie dovute a microrganismi che in esso si sviluppano Queste malattie sono: la *fioretta*, l'*acescenza*, l'*incerconimento*, l'*agrodolce*, la *viscosità*, l'*amarore*.

Per quanto si dica che gli agenti di tutte queste malattie sono bene noti, tuttavia ciò in realtà non è.

Mazè e Pacottet nel 1904 diedero la descrizione di germi che isolarono da vini affetti da diverse malattie: quattro forme da un vino amaro, quattro da un vino girato, due da un vino in preda alla fermentazione mannitica, sei cocchi a catena da vino bianco filante e da vini amari e girati, un cocco dal vino di *Champagne*.

Kayser e Mancen isolarono nel 1906 un batterio dal vino affetto dalla malattia del grassume, simile al fermento mannitico di Gayon e nel 1908 descrissero altri batteri corti a catena e aggiunsero che accanto a questi germi nella produzione della malattia agiscono altri germi saccaromiceti, specie capaci di produrre il bleu del vino di Champagne, nel senso che questi germi favorirebbero lo sviluppo dei germi specifici della malattia del grassume.

La diagnosi etiologica delle malattie del vino è quindi tutt'altro che sempre assodata. Ad ogni modo ecco i dati sui quali si può fondarla.

Fioretta. — Presenza di una pellicola bianca, polverulenta, facilmente disgregabile, sulla superficie del vino, formata dalle cellule ovoidali più o meno allungate, gemmanti, del *Saccharomyces mycoderma* o *Mycoderma vini*. Questo si sviluppa nei vini contenenti non più del 12-13 % di alcool e sviluppandovisi trasforma l'alcool in acido carbonico ed acqua. Non va confuso con il *Mycoderma aceti*, che rappresenta un gruppo di batteri i quali si sviluppano quando la quantità di alcool è diminuita sino a raggiungere il 10 %: essi sono causa dell'

Acescenza. — Presenza di una pellicola bianco-sporca, membranosa, non trasparente e non disgregabile, sulla superficie del vino, costituita da forme bacillari spesso gonfiate nel mezzo, riunite a due, a catena, a filamenti e rappresentati dal *Mycoderma aceti*, ossia dai batteri del-

l'aceto. Di questi oggidì se ne conoscono diversi, di cui non tutti però ossidano l'alcool per produrre acido acetico. I due principali sono il *B. aceticum* e il *B. pastorianum*, dei quali il primo predominerebbe nel vino malato, e sarebbe differenziabile dal secondo (!), perchè con la tintura di iodio rimane incoloro, mentre il bacillo pastoriano si colora in giallo.

Evvi anche chi ammette che i batteri acidificanti differiscano secondo la natura del vino nel quale si rinvengono e che sino ad un certo punto si possano differenziare dalle loro forme involutive (!) che sarebbero diverse (!).

Incerconimento o *subbollimento* o *cerchione*. — Il vino assume una colorazione violacea o bluastra, perde la limpidezza, s'intorbida e produce una spuma molto persistente, dovuta al grande sviluppo di acido carbonico. Questa malattia, per cui il vino si dice *girato*, è provocata da bacilli che al microscopio appaiono dritti, a estremi arrotondati, isolati o riuniti, piegati ad angolo o a ginocchio. Secondo Kramer si tratterebbe di un gruppo di bacilli (*B. saprogenes vini I-VII*) e di cocchi (*M. saprogenes vini I-II*), che produrrebbero, a spese delle sostanze azotate ed albuminoidi e poi dell'acido tartarico, una speciale putrefazione, la così detta fermentazione tartarica, cui sono predisposti i vini che provengono da uve peronosporate o ammuffite. Secondo recenti studi del Pavari, sarebbero i vini contenenti molte sostanze albuminoidee e zucchero i più predisposti. La causa sarebbe un bacillo già descritto da Pasteur identico a quello isolato e descritto da Mazè e Pacottet. Il Pavari crede possibile anche vi siano diverse razze di questo fermento del girato le quali si formerebbero per adattamento alle condizioni variabili del vino.

Agrodolce. — Il vino acquista un sapore dolciastro e s'intorbida: ciò è dovuto alla *fermentazione mannitica*, che si dice opera di batteri assumenti la disposizione a catena (streptobatteri) e che sono circondati da una sostanza mucilagginosa che li collega insieme: basta però trattarli con liquido di Lugol perchè le catenelle si scindano. Essi somigliano ai diplococchi dell'aceto, sebbene siano alquanto più grandi: le estremità sono arrotondate e nel mezzo presentano talora una leggera strozzatura che tende a far assumere ad essi la forma di bozzolo (Peglion). Questo germe può vivere tanto nella massa del liquido quanto alla sua superficie, ove forma un velo semitrasparente, bianco, con riflessi sericei.

Viscosità o grassume. — Il vino si trasforma in un liquido vischioso, come grasso od olio. In esso si è notata la presenza del *B. viscosus vini* di Kramer oltre ai germi più recentemente studiati e di cui ho già parlato.

Amarore. — Il sapore del vino diviene amaro-piccante: in esso si nota la presenza di bacilli lunghi, immobili, isolati, o riuniti a filamenti più o meno intrecciati, sui quali si depone la sostanza colorante, oltre ai germi sui quali ho più sopra riferito le osservazioni di alcuni studiosi.

3. Esame microscopico per riconoscere se il vino contenga germi patogeni. — Questa ricerca potrebbe parere oziosa perchè nei vini puri è dimostrato che i germi patogeni non possono vivere ed esistono anche ricerche positive sull'azione battericida dei vinelli.

La morte di questi germi non è però immediata e se i vini sono diluiti con acqua la durata della loro vita può accrescersi di molto.

Così Sabrazes e Marcandier trovarono che in un vino rosso comune (11 gradi di alcool) il B. del tifo viveva 2 ore; nello stesso diluito a metà con acqua, viveva 4 ore. Evvi però anche una diversità di azione tra vino e vino.

Così in un vino bianco dello stesso tenore di alcool gli stessi AA. trovarono che il B. di Eberth moriva dopo 20 minuti; dopo 30 nel Borgogna; dopo 10 nello Champagne.

Qualora si dovessero ricercare germi patogeni nel vino bisogna considerare il liquido come se fosse latte od acqua e procedere alle indagini batteriologiche necessarie.

Aceto.

L'esame microscopico dell'aceto si conduce come quello del vino per riconoscere la natura del deposito che in esso si trova e per vedere se è affetto da malattie.

Va soltanto notato che nell'aceto il deposito è quasi tutto rappresentato da microrganismi e costituisce il così detto *deposito poltaceo*, nel quale si trovano in grande copia i cadaveri dei batteri dell'aceto. Le forme batteriche viventi riunite a zooglee si trovano piuttosto verso la superficie.

Inoltre nell'aceto mal conservato e nel quale la quantità dell'acido acetico è inferiore al 4 % si può trovare un nematode, la così detta *Anguillula aceti*, visibile anche a occhio nudo, guizzante sulla superficie del liquido, quando, però, non si tratti di aceto molto vecchio.

Le malattie dell'aceto sono eticlogicamente poco conosciute.

Henneberg recentemente ha ricercato i germi che trovansi nell'aceto abbandonato a sè nelle botti e che lo rendono di cattivo gusto, amaro e torbido. Ne indica come causa il *B. ascendens* e il *B. xylinum*.

Birra.

Anche l'esame microscopico della birra può dirsi un esame microscopico nello stretto senso della parola solo finchè serve allo studio dei depositi della birra: lo è in parte invece, quando serve allo studio delle malattie microbiche della birra stessa.

1. Esame per riconoscere la natura del deposito. — Nella birra, lasciata depositare, si possono trovare, al fondo del recipiente, gli elementi dei materiali che sono stati adoperati per fabbricarla: quindi *granuli di amido* più o meno alterati e *residui dei semi dei cereali*, i quali si riconoscono dai caratteri già indicati nell'esame delle farine. Bisogna però ricordare che oltre a questi si possono trovare anche quelli appartenenti al *luppolo*, cioè piccole ghiandole lucenti e translucide che si distaccano dai coni di luppolo, e che costituiscono quella polvere gialla che va in commercio col nome di lupolino.

I *depositi di microrganismi* sono rari: si può rinvenire qualche cellula di *Saccharomyces cerevisiae*; in genere se queste abbondano, la birra è alterata.

2. Esame microscopico per riconoscere se la birra sia alterata da microrganismi capaci di determinarvi malattie. — Come il vino, la birra è soggetta alla malattia dell'*acescenza*, della *fermentazione lattica*, della *viscosità*, della *fermentazione putrida*, dell'*agrodolce*, ecc., e si riconoscono come causa di queste alterazioni batteri diversi, molti dei quali sono già noti come causa di malattie simili in altri liquidi. Così quello della fermentazione viscosa sarebbe, secondo Harrison, il *b. lactis aërogenes*.

Molti credono possibile giungere a diagnosi col solo esame microscopico, ma oggidì ciò è impossibile: occorre l'esame batteriologico e spesso anche il più delicato.

Però a differenza del vino, la birra può essere alterata anche per opera di blastomiceti speciali, oltre che dal *Sacc. mycoderma*, causa della fioretta. Così il *Sacc. exiguus*, caratteristico per le sue cellule piccole ovalari, dà alla birra una tinta opalina, verdastra e un gusto viscoso, la così detta *malattia verde;* il *Sacc. pastorianus I e III* di Hansen, caratteristici per le lunghe cellule a bodino e quelle ovoidali allungate, rendono la birra torbida e amara, ecc.

Recentemente si è anche riconosciuto un particolare germe, il *Pseudominus cerevisiae*, la cui azione non è ancora chiarita nelle birre in bottiglie.

3. Esame microscopico per riconoscere se la birra contenga microrganismi patogeni.

Conviene tenere presente che la birra, specie se imbottigliata, non è mai sterile: vi si trovano spesso milioni di germi per centimetro cubico. Tra di essi ne sono stati trovati anche di quelli patogeni per gli animali. La loro presenza si attribuisce a imperfetta pulitura delle bottiglie e al tappo.

Si ammette quindi che la birra possa essere veicolo di contagio di agenti infettivi anche per l'uomo.

La ricerca di questi germi si fa come se si dovessero ricercare nel latte, nell'acqua, ecc. (v. *Batteriologia*).

ESAME MICROSCOPICO DELL'ACQUA, DELL'ARIA, DEL SUOLO.

Acqua.

Al giorno d'oggi si dà poco peso all'esame microscopico di un'acqua, perchè l'esame chimico e l'esame batteriologico sono i più importanti, mentre non v'ha dubbio che esso, specificando in molti casi la qualità delle sostanze organiche le quali si trovano in un'acqua, può rilevare inquinamenti che nè l'esame chimico, nè l'esame batteriologico possono mettere in evidenza.

L'esame microscopico, infatti, può fornire il criterio per giudicare della potabilità di un'acqua, giacchè rivela la presenza di rifiuti animali e la fiora e fauna microscopiche che sono proprie di acque stagnanti o palustri.

Non possiamo però nascondere che per ottenere tale risultato, occorre che l'esame microscopico sia ben condotto, il che presuppone delle cognizioni un po' estese (le quali non sono sempre acquistabili dai non specialisti) nel campo degli esseri infimi del regno animale e vegetale. V'ha di più: non si ha oggidì ancora una traccia per condurre un esame microscopico, perchè nei trattati se ne parla o troppo superficialmente, o solo per fare un elenco di tutti i vegetali e animali inferiori che si conoscono dai botanici e dai zoologi.

1. *Tecnica da seguirsi per fare l'esame microscopico di un'acqua.*

Per procedere all'esame microscopico di un'acqua si raccoglie il campione con le stesse precauzioni colle quali si raccoglie per l'esame batteriologico (v. questo vol., *Batteriologia*), prelevando una quantità di acqua relativamente però molto abbondante, cioè 2-10 litri.

In genere, si lascia depositare l'acqua o entro un bicchiere a calice per 2-3 giorni, oppure entro recipienti appositi, cilindrici, terminati in fondo con tubulatura conica nella quale si applica a smeriglio un cappuccetto di vetro cavo, ove si raccoglie il sedimento od anche in cilindri, entro i quali si introduce una bacchetta di vetro che porta in fondo un disco concavo in alto, nel quale si raccoglie il sedimento, man mano che l'acqua esce a gocce da un rubinetto posto in fondo all'apparecchio.

Alcuni preferiscono filtrare l'acqua addirittura in sito, anche attraverso fogli di carta bibula, e raccogliere le ultime quantità che rimangono sul filtro: in quest'ultimo caso, si comprende che si può utilizzare nella filtrazione una quantità di acqua rilevante.

Il Sedgwick filtra l'acqua attraverso sabbia calcinata, separa il deposito organico dalla sabbia, disgregando questa in una quantità di acqua distillata 50 volte più piccola e decantando rapidamente il liquido. In questo ultimo lascia formare un deposito, che esamina al microscopio. L'enumerazione dei residui la fa poi servendosi di apposito apparecchio simile a quello di Malassez-Hayem, sul quale non è qui il caso di entrare.

Però, col metodo del Sedgwick, molto materiale va a fondo con la sabbia durante la decantazione e l'esame può dare risultati incompleti. Ad evitare in parte questo inconveniente, io mi servo di un filtro Maasen largo (fig. 254, ,), a fondo piatto, di porcellana porosa, e aiuto la filtrazione mediante l'aspirazione. Raccolgo, entro provette, gli ultimi 50 cmc. che rimangono sul filtro, avendo cura, prima di raccoglierli, di spazzolare il fondo del filtro con ap-

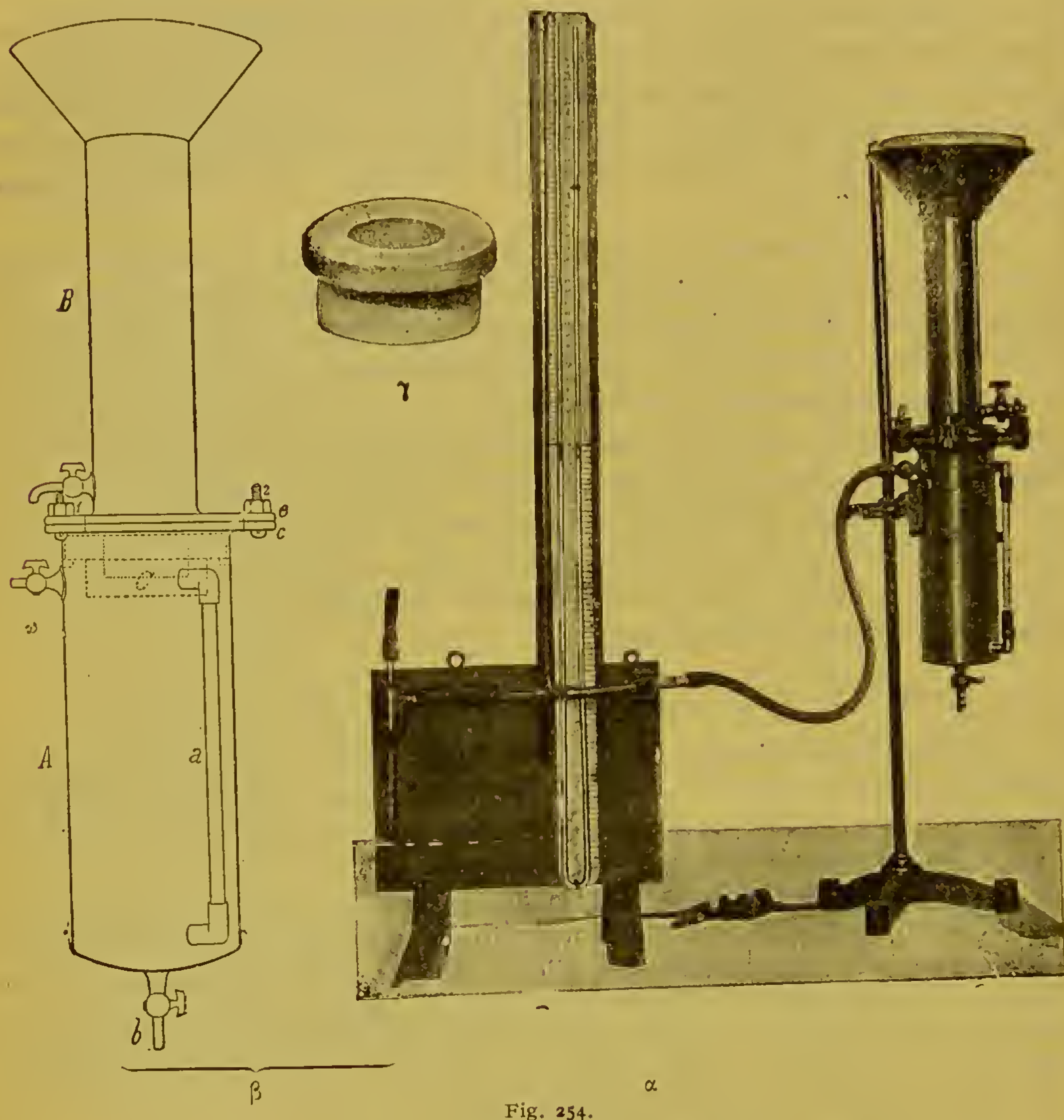


Fig. 254.

posito spazzolino sterilizzato. Centrifugo, decanto il liquido ed esamino il deposito dei tubi.

All'uopo ho costruito un apparecchio apposito (fig. 254, β). Esso consta di un cilindro metallico *A* della capacità ½-1 litro fornito di un livello (*a*) e nel fondo di un rubinetto (*b*). Nella parte superiore è aperto e porta ai bordi un disco piatto (*c*). Nell'interno, appena al disotto del disco, evvi un anello metallico, sul quale si adatta il bordo della candela Maassen *C* a mezzo di un disco di gomma. Lateralmente, al disotto del disco, evvi un rubinetto che si pone in comunicazione colla pompa aspirante (fig. 254, α).

Sul disco si colloca, coll'intermezzo di un largo anello di gomma, un tubo di metallo *B* fornito a sua volta di un altro disco metallico (*c*) al bordo. Questo tubo *B* è svasato in alto a imbuto, ha la capacità di ½-1 litro ed ha un diametro più stretto di quello del recipiente inferiore, e ciò perchè possa far pressione anche sui bordi della candela.

Si stringono i due dischi per mezzo di morse (1-2) applicate al disco (*e*) del recipiente *A*.

I pezzi *A* e *B* si sterilizzano divisi nella stufa a 100°, si riuniscono quindi compresa la candela (che frattanto è stata sterilizzata a secco) e si sterilizza ancora una volta nella stufa a 100°.

L'acqua da esaminare si versa nel recipiente superiore *B*: essa per mezzo dell'aspirazione fatta nel recipiente *A* passa in quest'ultimo attraverso la candela porosa, lasciando su questa depositati i materiali corpuscolari.

Man mano che passa se ne può aggiungere della nuova, avendo però cura, osservando (*a*), di svuotare ogni tanto il recipiente *A*. Ciò si fa aprendo il rubinetto in comunicazione con la pompa α dopo il distacco del tubo da quest'ultima, e poi aprendo il rubinetto (*b*).

L'esame del sedimento, comunque ottenuto, si opera facendo dei preparati a fresco o a goccia pendente. È inutile o quasi procedere a colorazioni, come si faceva una volta, perchè esse non servono che a svelare i batteri che si ricercano meglio coll'esame batteriologico.

Per i preparati a fresco, basta coprire la goccia posta sul portoggetti con un vetrino coproggetti e circondare il vetrino con paraffina, per evitare che l'acqua evapori durante l'osservazione microscopica.

Per i preparati a goccia pendente, occorre fare delle goccicle piccole per potere all'occorrenza servirsi anche di forti lenti a secco, a corta distanza focale. È consigliabile ad ogni modo di servirsi delle cellette di Ranvier, le le quali tolgono l'inconveniente della gocciola molto spessa, disponendosi il materiale in un unico sottile strato (v. *Batteriologia*, Parte generale).

2. *Reperto microscopico dell'acqua*. — Costituiscono il reperto microscopico di un'acqua residui minerali, residui organici, esseri viventi.

I *residui minerali* sono rappresentati da granuli o di forma irregolare, inattaccabili dalla maggior parte dei reagenti chimici (argille, quarzo), o di forma cristallina (carbonato e solfato di magnesia e di calcio, cloruro sodico, nitrato potassico, ecc.). Il trovare questi residui non permette di emettere alcun giudizio sull'acqua: del resto è coll'esame chimico che si procede allo studio dei suoi componenti minerali.

I *residui organici* che possono trovarsi nell'acqua di pozzo sono numerosi, e la loro ricerca è importante, sia perchè con essa si può dar maggior valore all'analisi chimica qualitativa delle sostanze organiche di un'acqua, potendo indicare che l'acqua non è difesa dagli inquinamenti, sia perchè può rivelare che con essa ha contatto la falda liquida superficiale, o che addirittura è allo scoperto.

Questi residui possono distinguersi in:

a) corpi di origine animale (sedimenti dell'urina, peli, piume, frammenti di fibre muscolari, gocciole di grasso, ecc.);

b) corpi di origine vegetale (amido, granuli di polline, trachee, fibre tessili, ecc.).

Gli *esseri viventi* che possono trovarsi nell'acqua, e per la cui ricerca è necessario il microscopio, sono numerosissimi e appartenenti al regno animale e al vegetale. Non tutti però debbono essere soggetti di ricerche speciali, ma soltanto quelli che hanno più diretto rapporto con l'uomo, rimanendo gli altri oggetto di ricerche d'ordine più generale.

Riguardo agli esseri appartenenti al regno animale non è necessario procedere alla diagnosi del genere o della specie delle forme di *Artropodi* che si possono rinvenire, ma basta indicare la presenza di forme del gruppo; invece è necessario procedere a ricerche più minute sia per i *Vermi*, perchè nell'acqua possono trovarsi o le uova o le larve di quelli che vivono parassiti nell'uomo, sia per i *Protozoi*, poichè non è escluso che si possano trovare nell'acqua le forme cistiche dei parassiti dell'uomo per la cui diagnosi è necessario procedere con grande rigore. Di più alcuni protozoi, per es. le amebe (Celli) e certi flagellati (Emmerich), inglobando batteri, possono contribuire all'autopurificazione batterica delle acque.

Così riguardo agli esseri appartenenti al regno vegetale, a parte gli ifomiceti e i blastomiceti che, a nostro avviso, debbono entrare nello esame batteriologico, si deve porre attenzione alle *Alghe*, senza che per altro sia strettamente necessario diffondersi in ricerche speciali sulle medesime. È però assai importante ricercare e diagnosticare quelle forme filamentose che fino a poco tempo fa si sono collocate nel gruppo dei « Fädenbakterien » o Batteri filamentosi, come le *Crenothrix*.

Ciò premesso, gli esseri viventi che o debbono maggiormente essere ricercati nelle acque o che più frequentemente possono trovarvisi sono i seguenti:

Vermi.

Vi si trovano uova, larve, vermi nello stadio adulto.

Le *uova* possono essere di:

a) *Trematodi*, cui appartengono il *Distoma hepaticum*, il *lanceolatum*, la *Bilharzia haematobia*, ecc.;

b) *Cestodi*, cui appartengono le *Tenie: solium, saginata, echinococcus, eucumerina, nana, leptocephala*, ecc.;

c) *Nematodi*, cui appartengono il *Tricocephalus dispar* tra i *Tricotrachelidi*, l'*Eustrongylus gigas*, lo *Strongilus longevaginatus*, l'*Anchylostoma duodenale* tra gli *Strongilidi;* l'*Ascaris lumbricoides*, il *mixtas*, ecc., tra gli *Ascaridi;* l'*Oxyuris vermicularis* tra gli *Ossiuridi*, ecc.;

d) *Acantocefali*, cui appartengono gli *Echinorrhyncus gigas, moniliformis*, ecc.

Esse si riconoscono dai seguenti caratteri che per maggior chiarezza riunisco nella seguente tabella:

TABELLA 92.

Vermi	Grandezza delle uova in μ	Forma delle uova	Caratteri del guscio	Contenuto delle uova
Distomum hepaticum Retzius	13-145 × 70-90	Ovoidale più stretta a un polo	Sottile, liscio, con un opercolo al polo più stretto, di colorito bruno-giallastro	Cellute addossate le une a le altre riempienti tutto l'uovo in modo da assumere una forma poliedrica.
Distomum lanceolatum Mehlis	38-45 × 20-30	Ovoidale a poli smussi	Sottile, liscio, con un opercolo a un polo e un ispessimento a forma di bottone all'altro, di colorito nerastro	
Bilharzia haematobia Cobbold	135-160 × 55-66	Ovale con un polo fornito di una spina o sperone lungo 20 μ.		
Taenia solium Rudolphi	31-36	Quasi sferica	Spesso, con striatura raggiata grossolana, giallastro	Embrione con 6 uncini (larva esacanta).
T. saginata Göze	30-40 × 20-33	Ovale	Idem più fina (?), giallastro	Idem senza uncini.
T. echinococcus von Siebold	32-36 × 25-30	Leggermente ovale	Poco spesso, giallastro, striato	Embrione con uncini.
T. cucumerina Bloch	43-50	Ovale	Sottile, chitinoso	Idem grande 32-36 μ.
T. Nana von Siebold	30-55	Ovale o ellittica	Costituito da tre strati anisti, trasparenti	Idem grande 16-19 μ.

Segue TABELLA 92.

Vermi	Grandezza delle uova in μ	Forma delle uova	Caratteri del guscio	Contenuto delle uova
Bothriocephalus latus Bremser	68-71 × 44-45	Ovale o ellittica	Sottile, con un opercolo a un polo, brunastro	Segmentato.
Trichocephalus dispar Rudolphi	51-53 × 21-23	Ellittica	Spesso, con due prominenze ai poli, giallo bruno	
Eustrongylus gigas Diesing	64-68 × 40-44	Ellissoide un po' assottigliata ai poli	Membrana esterna liscia ai due poli e incavata da numerosi infossamenti nel resto, brunastra, meno ai due poli ove è incolore; membrana interna liscia	Embrione.
Anchylostoma duodenale Dubini	51-55 × 32-43	Ellittica	Sottile a contorno liscio e regolare, non colorato	Segmentato appena espulso, contenente l'embrione grande 210 × 44 . più tardi.
Ascaris lumbricoides L., uova fecondate	50-75 × 40-58	Ovoidale o sferica	Involucro esterno (membrana albuminosa) bernoccoluta giallastra Involucro interno sottile a doppio contorno, regolare	Granuloso appena eliminato, nell'acqua si può trovare però coll'embrione.
Ascaris lumbricoides L., uova non fecondate (Barbagallo)	52 62	Ovoidale molto allungata; raramente sferica	Involucro esterno meno spesso e sovente mancante Involucro interno più spesso del corrispondente delle fecondate	Gocciole gialle splendenti riempienti tutto l'uovo.
Oxyuris vermicularis Bremser	50-54 × 16-27	Ovale con una faccia appiattita e una curva	Sottile, liscio	Embrione giriniforme.

Caratteri delle uova dei vermi che si trovano nelle acque. — Le *larve* che possono trovarsi nell'acqua sono i *miracidi* o embrioni cigliati del *Distoma hepaticum*, l'embrione del *Bothriocephalus latus*, le larve di *Anguillula intestinalis* e *stercoralis*, le larve delle *Filarie*, le larve di *Anchylostoma duodenale*. Per la descrizione di tutti questi esseri vedi *Parassitologia*.

I *vermi adulti*, che possono trovarsi nell'acqua, non hanno stretto rapporto con l'uomo: sono i *gordii*, di cui possono però trovarsi anche le *larve*; i *rotiferi*, i quali spesso sono stati confusi con gli infusorii e che si distinguono per avere il corpo esteriormente segmentato, senza che ad ogni divisione corrispondano degli organi interni, per avere la estremità anteriore munita di un apparecchio ciliare spesso retrattile: un esempio si ha nel comune *Rotifer vulgaris*, ecc.

Protozoi.

I protozoi, che si possono trovare nelle acque, sono numerosissimi. Però fra di essi le forme importanti, per essere parassite dell'uomo, sono poche, e per queste va in ogni caso tenuto presente che nell'ambiente e quindi nell'acqua è dubbio se alcuna se ne trovi nello stadio di vita libera (come viene invece comunemente creduto e riferito nei trattati). Ne consegue che le forme protozoiche, conducenti vita libera nell'acqua, non possono avere per noi che un interesse biologico generale.

I protozoi che si trovano in vita libera nell'acqua sono specialmente rappresentati da esseri appartenenti alle classi dei *rizopodi*, *mastigofori*, *cigliati*, *suctorii* (v. questo volume, *Protozoologia*).

Tra i rappresentanti della classe dei *rizopodi* si trovano:

a) le *Amoebae* (forme a protoplasma nudo dotate della proprietà di emettere pseudopodi e ritirarli, ecc.); v. anche *Protozoologia*;

b) le *Arcellae* (forme a protoplasma esternamente indurito a guisa di guscio, ecc.);

c) le *Difflugiae* (forme in cui per la cementazione dei corpuscoli estranei come granuli di sabbia, scheletri di diatomee, ecc., si ha la formazione di una corazza che a volte ha forma di un uovo e che presenta un'apertura per la fuoriuscita dei pseudopodi, ecc.);

d) i rappresentanti del gruppo degli *eliozoi*, che sono forme nude o con guscio, per lo più di forma sferica, emettenti pseudopodi filiformi da ogni punto della superficie del corpo, per cui si dicono anche *animaletti da sole*, come ad esempio l'*Actinophris eichhornii*, ecc.

Tra i *mastigofori* si trovano i rappresentanti dei due gruppi dei *Flagellata* e dei *Dinoflagellata*, cioè:

a) il *Bodo ovatus* e *saltans* tra le *Protomonadine:* sono capaci di ingoiare il bacillo del tifo, purificandone le acque che lo contengono;

b) il *Cercomonas* o *Dimorpha longicauda* tra i *Dimorpha;*

c) la *Monas guttula* tra i *Monas*, caratteristiche forme nude ovali, rotonde o fusiformi, che al punto del flagello principale portano per lo più un'apertura boccale, dietro cui stanno vescichette e nuclei;

d) le *Euglene*, caratteristiche per il loro corpo fusiforme che ricorda la forma di un pesce;

e) la *Dendromonas virgaria* tra le *Dendromonadi*, caratteristiche colonie di animaletti riuniti insieme sopra un gambo che si ramifica;

f) le *Volvox*, caratteristiche colonie di animaletti tenuti insieme da un involucro gelatinoso, come, per esempio, la *Pandorina morum*.

Tra i *cigliati* si notano tutti i rappresentanti di vari gruppi degli:

a) *Holotricha*, come la *Phialina vermicularis*, il *Dileptus margaritifer*, il *Paramoecium bursaria*, caratteristici per avere il corpo coperto di fine ciglia, le quali possono ritenersi indifferenziate anche in vicinanza del cifostoma;

b) *Heterotricha*, come lo *Stentor polimorphus*, caratteristici per avere il corpo ricoperto tutto di ciglia, le quali in corrispondenza del peristoma sono lunghe e disposte in vari sensi (obliquo, a spirale, ecc.);

c) *Hypotricha*, come la *Stylonichia pustula*, caratteristici per la loro forma bilaterale e per possedere le ciglia solo alla faccia ventrale;

d) *Peritricha*, come le *vorticelle*, caratteristiche per la loro forma sferica o cilindrica nuda o eccezionalmente con un incompleto rivestimento di ciglia e in generale con una serie periviale di ciglia lunghe.

Anche dei *suctorii* si trovano alcuni rappresentanti: la loro caratteristica è che nello stadio adulto non possiedono ciglia nè altri organi di movimento (v. anche *Protozoologia*).

I protozoi che non si trovano in vita libera nelle acque, ma che vi si possono trovare nella fase cistica provenienti dalle feci dell'uomo, dovrebbero essere: l'*Entamoeba hominis* (*Amoeba coli*); il *Megastoma entericum* s. *Lamblia intestinalis*; il *Balantidium* s. *Paramoecium coli*, per la descrizione dei quali vedi la *Protozoologia*.

Si dovrebbero poter trovare anche le cisti del *Trichomonas hominis* (v. *Protozoologia*); ma non è ancora stabilito se quelle descritte per tali appartengano a questo parassita e siano delle vere cisti.

Alghe.

Le alghe che si possono trovare nell'acqua sono moltissime e appartengono alle più diverse famiglie. Si rinvengono infatti rappresentanti:

1º delle *Chroococcacee*, come il *Chroococcus turgidus*, rappresentato da cellule a contenuto verde-azzurro, circondate da una membrana spessa, incolore; la *Policistis marginata*, caratteristica per il suo involucro gelatinoso incoloro, disposto in diversi strati concentrici, ecc.;

2º delle *Nostococcacee*, come i *Nostoc*, rappresentati da masse gelatinose in cui stanno filari di cellule sferiche, olivastre, ecc.; le *Oscillariacee*, rappresentate da cellule riunite assieme, coi setti divisori non bene visibili, contenenti un protoplasma granuloso, caratteristiche perchè le estremità oscillano lentamente a destra e a sinistra e viceversa, ecc.;

3º delle *Palmellacee*, come il *Pleurococcus angulosus*, rappresentato da cellule grandi 7-12 μ, a contenuto verde, isolate o riunite in piccoli gruppi

da una membrana spessa, come i *protococchi*, colle loro cellule di diversa grandezza, fra cui il *P. infusionum*, che è il più grande, è formato da cellule di 15-45 μ, di colorito verde, con una membrana a sottili strati, spessa e o liberamente nuotante o immobile, e in questo caso in piani spesso numerosissimi;

4° delle *Confervacee*, come la *Cladophora glomerata*, alga filamentosa i cui filamenti contengono corpicciuoli verdastri poligonali (cloroplastidii) giustapposti, fra i quali si trovano poi altri corpi di diversa natura: i singoli filamenti sono costituiti da cellule spesse 30-50 μ e 2-6 volte più larghe che lunghe;

5° delle *Zigmenacee*, come il *Zigmena pectinatum*, alga filamentosa a filamenti o isolati verdi o giallo-verdastri, costituiti da cellule spesse 18-50 μ, od avvicinati e in contatto per la pressione di due cellule; le *Spirogire* o *Coniugate*, le quali, come le precedenti, sono delle alghe filamentose riconoscibili perchè entro ai singoli elementi cellulari si contiene un protoplasma incolore e dei grandi corpi clorofillacei verdi disposti a spirale;

6° delle *Diatomee* o alghe a guscio siliceo, fra cui alcune delle *Naviculacee*, come la *Navicularia viridis*; alcune delle *Scalprae*, come lo *Scalprum attenuatum* (*Pleurosigma att.*); alcune delle *Meridiae*, come il *Meridion circulare*, ecc., e così via dicendo i rappresentanti di altre famiglie, sui quali non insisto.

È importante notare che in alcune sorgenti si può trovare la roccia coperta di un tappeto rosso-sangue il quale dà subito l'idea di trovarsi di fronte ad acque ferruginose.

Stringendo fra le dita frammenti di roccia così coperti se si ha la impressione di una untuosità, deve però subito nascere il sospetto si tratti di un materiale di natura organica per la cui diagnosi occorre raschiarne un poco ed esaminarlo al microscopio. Se si trovano grossi elementi tubulari con parete a doppio contorno e setti di un colorito verdognolo mentre il contenuto degli spazi in essi racchiusi si presenta di un colorito rosso-scuro, giustapposti gli uni agli altri in modo da costituire dei lembi di struttura alveolare col contenuto degli alveoli colorati in rosso-scuro, si è di fronte ad un'alga comune d'acqua dolce l'*Hildebranthia rivularis*.

Batteri filamentosi.

L'esame microscopico di un'acqua può, in casi speciali, per sè solo, scartare un'acqua potabile dall'essere condotta, potendo mettere in evidenza quei germi che dànno luogo a produzione di tubercoli ferruginosi e ostruzioni nei tubi di ghisa.

Nei trattati in genere si parla di *Crenothrix*, di *Cladothrix*, di *Leptothrix*, come di forme microscopicamente distinte e separate; però basta leggerne le descrizioni per comprendere quanto i loro caratteri siano indecisi, e come sia difficile differenziarli.

Basti dire che stando ai dati dello Zopf per l'identificazione della *Crenothrix* al microscopio si dovrebbe procedere:

1° al rinvenimento di corpuscoli sferici con i caratteri delle macrospore e delle microspore e di corpuscoli coccacei derivanti dalla moltiplicazione dei gonidi;

2° al rinvenimento dei filamenti ferruginei articolati, con articoli capaci di uscire dalla guaina e di filamenti contenenti gonidi, capaci di germinare nel loro interno.

Si tratta « di esseri (Gasperini) che descritti ora come alghe indifferenti di acque termali, ora come bacilli filamentosi, si prestavano a ricevere appellativi generici e specifici vari », ma che in fondo possono benissimo riannodarsi al gruppo delle *Beggiatoe*. Per la loro ricerca, stando agli studi del Gasperini, non sarebbe necessario fermare l'attenzione su alcuna forma sferica e delle forme filamentose, bisognerebbe escludere dal ciclo della *Crenothrix* quelle che non rientrano nei tre tipi di filamenti ferruginei e cioè di filamenti vitrei, a contenuto omogeneo o a contenuto articolato (ma mai ad articoli bacilliformi) e di filamenti ondulati.

I batteri filamentosi, da prendersi in considerazione sarebbero perciò rappresentati da filamenti dritti o variamente incurvati, privi di regola di ramificazione, continui e a volte articolati, a estremità ricurve, dotati di movimenti anguiformi o immobili, forniti di granuli rifrangenti, aventi addossate granulazioni, credute erroneamente di zolfo, moltiplicantisi per scissione, mai per spore, sviluppantisi specialmente nelle acque termali solforose in fiocchetti che diconsi gleicina o baregina.

Le forme più importanti, le cui descrizioni i trattatisti si tramandano l'uno all'altro, sarebbero: la *Crenothrix kühniana* o *polispora*, la *Beggiatoa alba* e la *Cladothrix dichotoma*, la *Leptothrix valderia* e *ocracea*

Stando al Gasperini, a parte le conclusioni che sono state fatte descrivendo per crenotrix, beggiatoa, ecc. le forme e di alghe e di batteri che si trovano insieme ad essi, facendoli magari passare per stadî di sviluppo dei medesimi, sarebbero beggiatoe, ad elementi lunghi sottili ed indivisi, le forme leptotrine di Valderi, e dovrebbero chiamarsi *Beggiatoa tenuissima*: lo stesso si dica della *Tiothrix tenuissima* di Winogradsky.

Sarebbero beggiatoe ad elementi più grandi, ma con tutti i caratteri delle beggiatoe vere, la *Beggiatoa alba*, simile se non la stessa della *Crenothrix* che l'A. chiama *Beggiatoa kühniana;* così pure sarebbe una beggiatoa la *Beggiatoa major*, ecc.

Alle beggiatoe bisognerebbe ancora riportare quell'alga che l'Ehrenberg chiama *Galionella ferruginea*, che fu descritta come uno spirocheto a lunghi filamenti sottili, isolati o avvolti tra di loro in diverse fogge A questo tipo corrisponderebbero stadî anormali di *Crenothrix*, i cui filamenti, invecchiando o perdendo la vitalità, dànno luogo a forme a rovescio che si scindono in nastrini sottilissimi, in parte avvolgendosi ad elica, nonchè un'alga che il Pellegrini avrebbe potuto allevare in laboratorio e che l'A. ritiene una individualità ben distinta, differente dalla *Crenothrix*.

Rimarrebbe quindi solo da discutersi intorno all'esistenza della *Cladothrix dichotoma*, la quale così come si descrive generalmente è un'alga, uno *Streptothrix*, ecc. ed è inidentificabile. Il Gasperini dice: « se non sono acca-

duti equivoci con gli *actinomyces*, con le *leptothrix*, con i *bacillus*, è probabile che per *Cladothrix* si sia inteso indicare quelle forme delle alghe che stanno per prendere o che non lasciano più vedere la clorofilla, che sono sottili e con articoli simili a quelli dei bacilli più elevati, che non sono coltivabili nella gelatina, nell'agar e nel brodo, immobili, senza ramificazioni ed aventi una posizione incerta nella sistematica ».

Ad ogni modo conviene separare dalle beggiatoe in genere e dalle *Crenothrix* in ispecie quelle forme filamentose che sono state descritte erroneamente come *Crenothrix*, perchè hanno la proprietà di assorbire il ferro sotto forma di ossido idrato, e che sono dei veri ifomiceti. Si differenziano perchè hanno ramificazioni vere, filamenti variamente spessi a rigonfiamenti bruschi, con tratti nei quali le deposizioni granulari non nascondono la struttura dei filamenti e poi per la loro notevole resistenza all'acido ossalico. Il Pellegrini ha infatti dimostrato sperimentalmente che tali proprietà le posseggono il *Mucor mucedo*, il *Penicillium glaucum*, il *Thamnidium elegans* e anche delle alghe diverse dalle beggiatoe, come la *Spirogya elongata*.

Tra tutte le beggiatoe la più importante è la *Beg. Kühniana* che a preferenza di altri esseri dà luogo ai molteplici inconvenienti conosciuti sotto il nome di *Crenothrix*.

Nelle pareti di questo microrganismo (*Beg. kühniana* Gasp.) si fissa del ferro sotto forma di ossido ferrico organoide e questo processo di fissazione più che essere legato con la necessità che ha il microrganismo stesso dei sali di ferro per vivere e moltiplicarsi, rappresenta un fenomeno biochimico complesso che finisce con la morte e la disorganizzazione della parte assile o vitale dei filamenti, i quali, a processo inoltrato, vengono solo rappresentati da guaine vuote ed inorganiche, completamente solubili in acido ossalico come in altri solventi dell'ossido ferrico. Per lo sviluppo della *Beggiatoa kühniana* possono venire otturate, però, non solo le condutture di ghisa, ma anche quelle di terracotta, di piombo o di qualsiasi altro materiale con la differenza, che mentre in quelle di ghisa si ha lo svolgersi di un fenomeno molto complesso che iniziandosi con la produzione di tubercoli ferruginosi, prosegue con la compartecipazione ed alterazione delle pareti e può terminare con l'ostruzione quasi completa di lunghi tratti di conduttura, negli altri tubi invece le ostruzioni si trovano dove vengono favorite da condizioni meccaniche, e ciò per l'accumulo dei filamenti e per l'ammassarsi e il succedersi di numerose generazioni di microrganismi i più diversi, i quali mentre da un lato ostacolano la normale circolazione dell'acqua, dall'altro contribuiscono ad alterarne i caratteri in guisa da ridurla perfino inservibile a qualsiasi uso domestico.

La *Crenothrix* (fig. 255) si riconosce con discreta facilità nelle condutture di ghisa, esaminando i tubercoli ferruginosi dove si può trovare nella sua forma filamentosa fornita di una guaina spessa e rigida o sotto forma di filamenti elicoidali, se il suo sviluppo è da tempo arrestato: però in alcuni casi essa può non esserci più, e allora l'esame dei tubercolo rimane negativo, il che naturalmente non autorizza a negare che essa vi sia stata.

Quando invece si tratti di condutture di altro materiale o di sorgenti, si cercano quei fiocchetti ocracei che stretti fra il pollice e l'indice dànno l'impressione di una sostanza untuosa e che contengono una sostanza polverulenta, argillosa, e si esaminano al microscopio.

Ecco, ad esempio, un dettagliato reperto, eseguito dal Gasperini, di cespugli di *Crenothrix*. Egli li trovò costituiti da un gran numero di filamenti (fig. 255 *a*) di colore ocraceo, intrecciati, incurvati, serpiginosi, lunghissimi, spessi 1-7 μ, i più sottili a parete incolora, i più grossi a parete cupa molto rifrangente: sulla parete dei filamenti non c'era vestigio di colore cremeus ed il contenuto non appariva differenziato. Avevano l'aspetto di tubicini vitrei organoidi, con pareti liscie, regolarmente cilindrici; nei più colorati, era bene apprezzabile una linea scura ed omogenea verso l'asse dei filamenti; gli estremi erano tronchi, in genere senza ramificazione. Però nella *Beggiatoa media* notò anche dei filamenti incolori, molto rifrangenti, costituiti da articoli bacilliformi con movimento oscillatorio, dei quali i più sottili presentavano vere e proprie ramificazioni (*Beggiatoa ramosa?*).

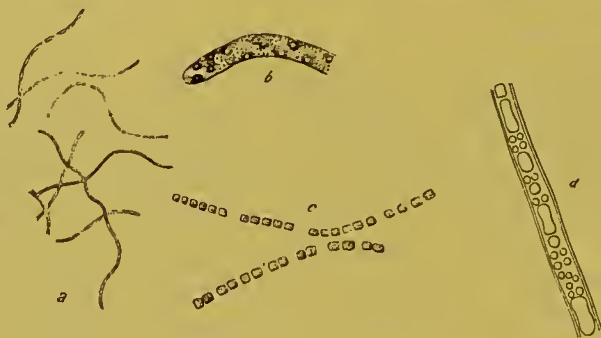


Fig. 255.

In altri casi si trovarono forme grandi con guaina ferrica spessa (fig. 255 *d*), pseudoramificate o con vere ramificazioni dovute al fatto che i filamenti, trovandosi addossati, venivano saldati assieme dalla guaina ferrica, e così si finiva col produrre fortuitamente una vera ramificazione.

Finalmente egli trovò filamenti lunghi, sottili (μ 1-1.7), isolati o fra di loro avvolti a spira, più o meno numerosi, cui diede il significato di forme anomale di *Crenothrix* per sfibramento dei filamenti invecchiati o morti.

Colorando i cespugli con i comuni colori di anilina, i filamenti incolori si colorano facilmente e intensamente, quelli organoidi no. Trattandoli coll'iodio questi ultimi mostrano nell'interno come un sottilissimo filamento spezzato in tanti articoli più o meno lunghi, i quali occupano regolarmente l'asse della guaina ferrica o vi si dispongono irregolarmente. Trattando poi i cespugli con acido ossalico, scompaiono le guaine ferriche (fig. 255 *b*) e rimangono dei filamenti ialini sottilissimi continui o con linee trasversali più rifrangenti e qualche volta con una serie di punti più rifrangenti disposti a catenella (fig. 255 *c*), ecc.

Le *Crenothrix* sono incoltivabili: solo il Pellegrini avrebbe ottenuto, per pochi giorni, lo sviluppo della *Beggiatoa alba* in acqua distillata, ad-

dizionata di poche gocce di brodo e di 0.001-0.01 % di solfato e cloruro ferroso.

Non si deve però credere che quando in una data acqua sospetta di produrre tubercoli ferruginosi, l'assenza della *Crenotrix* basti ad eliminare questo sospetto, giacchè ciò significherebbe dimenticare che nei tubercoli ferruginosi, sono stati trovati molti altri germi ai quali si attribuiscono le stesse proprietà furruginee.

Vi sono anzitutto degli Ifomiceti, i cui micelî hanno la capacità di assorbire il ferro specialmente nel loro protoplasma: tra essi quelli dell'Adler ed il *Mucor stolonifer*, secondo Gasperini, il quale si può presentare con filamenti a doppia parete intensamente ocracei, capaci di assottigliarsi fino ad uguagliare il diametro della *Crenothrix*.

A questi va aggiunta la *Gallionella ferruginea* dell'Ehrenberg formata da articoli disposti a catene bacilliformi, diramantisi da due fili sottilissimi, germe che si dubita dal Gasperini essere identico alla *Leptothrix ocracea* e del quale recentemente lo Schwers riferisce una descrizione dettagliata in depositi osservati nelle ocre delle acque ferruginose del Belgio, insistendo sopra diversi suoi aspetti normali ed anormali.

Si parla anche dallo Schwers della *Gleosfera*, della *Cladothrix fusca*, dell'*Antilophysa vegetans*, di varie *Diatomee* e di vere e proprie Alghe verdi.

Nello stesso gruppo delle Batteriacee si citano, *Actinomiceti* (come quello di Nadson e di Gasperini), degli *spirilli* e dei veri e propri *Schizomiceti*.

Lo stesso Gasperini ritiene giustificato che essi si annoverino fra i concomitanti ordinari del fenomeno *Crenothrix* e che loro si attribuisca la proprietà di favorire anche da soli o di cooperare al prodursi nelle condutture di ghisa dei tubercoli ferruginosi.

Ciò da un canto: dall'altro non bisogna dimenticare che la produzione dei tubercoli ferruginosi non si ritiene de molti legata all'azione specifica dei batteri ferruginosi.

Riferendoci solo alle più recenti ricerche al riguardo basterà ricordare che lo Schwers in 208 esemplari delle acque del Belgio ha trovato solo 160 volte i batteri ferruginei; di questi 51 contenevano la *Leptothrix ocracea*, 18 la *Gallionella ferruginea* e 91 ambedue le specie. Lo Schwers ha osservato anche piccoli batteri che identificò con quelli di Adler e tutto ciò insieme a delle Alghe verdi (50 volte su 60) e a delle Diatomee (41 volte su 160). Infine dice di avere osservato 21 depositi con sole Alghe verdi e 22 che non contenevano che delle Diatomee.

Certo questo autore non nega che i batteri ferruginosi precipitino il ferro disciolto nell'acqua e possano formare dei depositi ocracei. Però ritiene costituisca solo un'eccezione il potere attribuire all'attività dei batteri ferruginosi la formazione di tali depositi, anzi che si debba ammettere che i batteri ferruginosi non abbiano che un'importanza accessoria nella formazione dei depositi ocracei, in relazione anche cogli studi del Molisch, il quale avrebbe osservato che i depositi si costituiscono senza bisogno dei microrganismi, pur essendovi certi casi in cui questi germi possono prendere parte alla formazione e alla composizione dei minerali di ferro.

Questi diversi modi di intendere la genesi dei tubercoli ferruginosi è in relazione con la difficoltà incontrata nel precisare la causa della loro forma-

zione nei singoli casi Senza citare qui la vasta letteratura relativa all'argomento riferiamo le importanti conclusioni al riguardo cui viene lo Schwers nel più volte citato lavoro. Cioè che:

1) nelle acque sotterranee ferruginose che giungono alle superfici si formano dei depositi di ocra rossa per precipitazione del ferro in soluzione in seguito all'ossidazione dell'idrato colloidale di ferro e alla separazione dell'anidride carbonica che lo mantiene disciolto: questi depositi d'idrato ferrico, di limonite, trattengono meccanicamente delle combinazioni organiche ferruginose o no in sospensione nell'acqua;

2) nelle stesse acque che pervengono alla superficie del suolo si formano dei depositi di ocra gialla per flocculazione: le materie organiche che accompagnano il ferro sono ossidate (direttamente per mezzo dell'ossigeno dell'aria o coll'intermediario dell'idrato ferrico) e sono subito precipitate dal ferro, sia combinate, sia agglutinate: questo deposito di materie organiche ferruginose può trattenere meccanicamente delle materie organiche e dell'idrato ferrico in sospensione nell'acqua;

3) queste due grandi specie di depositi, di cui si intravede ogni varietà possibile come le proporzioni di idrato ferrico e di materie organiche ferruginose o no, si complicano ancora per la presenza nell'acqua di manganese, di silice, di alluminio, di calce, ecc., in soluzione od in sospensione, trattenute per la flocculazione dei composti ferrici e umici oltre al fatto che gli idrati di manganese, di alluminio e di calce possono combinarsi come l'idrato di ferro alle materie organiche.

Come si vede la quistione è quindi complicata e la risoluzione del quesito, se una data acqua potabile, possa col tempo, essendo allacciata con una conduttura di ghisa, produrre in questa dei tubercoli ferruginosi, esclusa in essa la presenza della *Crenothrix* e di qualsiasi altro germe ferruginoso, potrebbe restare dal punto di vista chimico insoluta.

Per poter eseguire con qualche probabilità di successo, la ricerca dei germi descritti, in un'acqua, prima che questa venga condottata, occorre a nostro avviso una tecnica particolare che permetta di poter da un canto procedere al rilievo in sito del materiale da sottoporsi all'esame microscopico e dall'altro di mettersi nelle condizioni di poter escludere o ammettere la possibile produzione di tubercoli ferruginosi nelle condutture.

Si può perciò accedere al luogo d'esame con una cassetta divisa in vari reparti, ciascuno dei quali contiene speciali apparecchi a seconda dello scopo cui sono destinati e cioè:

I. *Apparecchi che permettono già nel sito di procedere alla raccolta del materiale sospeso in grandi quantità di acqua.*

Per tale scopo serve l'apparecchio che ho già descritto per l'esame microscopico dell'acqua, munito di un corpo di pompa aspirante-premente.

Inoltre nella cassetta devono trovarsi:

a) una candela Maassen, grande, sterilizzata, avvolta in carta bibula;

b) un grosso tappo di gomma avvolto in carta bibula e sterilizzato per chiudere il foro della Maassen, a filtrazione finita;

c) un robusto sostegno di ferro per tenere sospeso l'apparecchio suddetto in sito.

II. *Strumenti che permettono l'impianto in sito di un dispositivo diretto alla ricerca nell'acqua in esame dei batteri ferruginosi* (fig. 256).

Essi consistono:

a) in un tubo di ghisa contenente pezzetti di ghisa e polvere di ferro, che può essere lungo cm. 65 e largo mm. 35 con un estremo pervio e l'altro chiuso da una calotta di ghisa del diametro di cm. 4.5 e della lunghezza di cm. 5-6, possedente un foro nel suo centro del diametro di 1 cm. nel quale è avvitato un rubinetto;

b) in un filtro grossolano a rete metallica, sulla quale si può disporre, ma molto lassamente, della lana di amianto, filtro nel quale si pongono pezzi di ghisa o limatura di ferro.

Come tale serve un cilindro di metallo, con un'estremità terminante

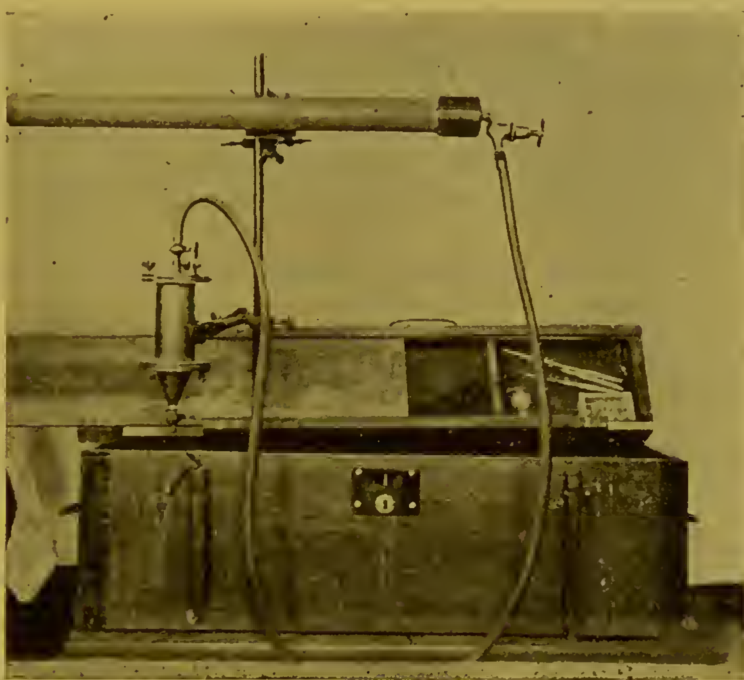


Fig. 256.

ad imbuto, in cui si mette dell'amianto e alla base del quale trovasi una reticella metallica che trattiene i pezzi di ghisa e la limatura di ferro nell'interno del cilindro, e coll'altra estremità rappresentata da un coperchio, fissabile per mezzo di viti.

Il fondo dell'una e dell'altra estremità del filtro è munito di un rubinetto, di cui il superiore corrispondente al coperchio serve per il raccordo col tubo di ghisa già descritto, l'altro corrispondente all'estremità imbutiforme del cilindro serve per lo scolo dell'acqua.

Naturalmente il tubo di ghisa raccordato col filtro è sterilizzato sotto pressione e tutti e due posti nella cassetta già uniti uno coll'altro a mezzo di un robusto tubo di gomma, lungo circa 1 m. e ½, con tutti i rubinetti chiusi e coll'orifizio pervio del tubo di ghisa tappato con ovatta sterilizzata.

Quando sorga il dubbio che delle cause esterne influiscano sul deterioramento dei tubi di ghisa, si può aggiungere nella cassetta un tubo di acciaio, rivestito di tela juta incatramata, come quelli che si trovano in commercio fabbricati dalla Casa Mannesmann e conosciuti perciò sotto il nome di *tubi Mannesmann*.

Nella stessa cassetta in reparti separati sono contenuti:

1° un refrigerante, per i campioni di acqua, che eventualmente può capitare di dovere prelevare e per la candela Maassen, costituito da una cassetta rettangolare di zinco in una delle faccie della quale inferiormente evvi un foro in cui è avvitato un rubinetto per lo scarico dell'acqua derivante dallo scioglimento del ghiaccio;

2° raschini per l'asportazione di eventuali incrostazioni che possono riscontrarsi nella roccia in vicinanza o a diretto contatto della località in cui si preleva l'acqua;

3° bottigliette di vetro a collo largo e tappo smerigliato, sterilizzate, per la raccolta di dette incrostazioni o di elementi vegetali eventualmente esistenti nell'acqua, nel punto di prelevamento;

4° un recipiente di ferro smaltato con manico, sterilizzato e portato avvolto in carta sterilizzata per la raccolta dell'acqua tanto per la filtrazione in sito, quanto per versare l'acqua stessa in appositi recipienti, da portare in laboratorio;

5° filo zincato, bolli di piombo e tanaglie fissabolli, carta pergamenata e fili di seta sterilizzati.

Con i vari apparecchi contenuti nella cassetta, giunti nella località in cui si deve prelevare l'acqua, le operazioni da espletarsi sono di duplice ordine:

1° filtrazione dell'acqua a mezzo dell'apparecchio descritto;

2° impianto del tubo di ghisa raccordato col filtro di amianto e in diretta comunicazione, col suo orifizio pervio, colla vena acquea sorgiva.

Per il primo scopo, collocato opportunamente l'apparecchio nel sostegno di ferro, e raccordato il rubinetto superiore del cilindro inferiore col corpo di pompa, tenendo chiusi tutti i rubinetti, a mezzo del recipiente di ferro smaltato, si versa l'acqua nel cilindro ad imbuto. Si apre quindi il rubinetto superiore del cilindro inferiore, nel quale, facendo funzionare il corpo di pompa, si determina il vuoto.

L'acqua filtra così attraverso la candela Maassen, privandosi di tutti gli elementi corpuscolari, che vengono trattenuti nell'incavo a ditale del filtro.

Mano mano che l'acqua filtra se ne aggiunge della nuova e si prosegue in questa operazione fino a che essa raggiunge un certo livello nel cilindro inferiore dell'apparecchio.

Allora tolto il raccordo col corpo di pompa e aperti i rubinetti del cilindro inferiore, si fa defluire completamente l'acqua in questo contenuta. Dopo di che si ripete lo stesso procedimento e così si prosegue fino a che sono filtrate grandi quantità di acqua (ad es. 10-50 litri).

A operazione finita si separano le due parti dell'apparecchio, si chiude col grosso tappo di gomma il foro della candela Maassen, la quale avvolta in carta pergamenata sterile, si colloca nel refrigerante.

Per il secondo scopo, il tubo di ghisa si mura in sito coll'orifizio pervio in diretta comunicazione colla vena acquea sorgiva, mentre il filtro

di amianto, con esso raccordato, si dispone a un livello quanto più è possibile inferiore.

Naturalmente, murato il tubo e disposto il filtro in opportuna posizione, va tolto il tampone di ovatta all'orifizio pervio del tubo di ghisa e vanno aperti tutti i rubinetti, perchè l'acqua possa penetrare e defluire liberamente.

Nella sua libera uscita l'acqua è ostacolata da un lato dalla calotta di ghisa, avvitata ad un'estremità del tubo di ghisa, dall'altro dal filtro di amianto: in questo modo essa è costretta a subire una remora tra i frammenti di ghisa e la polvere di ferro, realizzandosi così una delle condizioni atte alla formazione dei tubercoli ferruginosi, perchè, se è vero che alcuni pratici osservarono la formazione dei medesimi nelle condotte in cui non era ostacolato il libero deflusso dell'acqua, si trattava però di condotte forzate.

Trascorso un tempo più o meno lungo (non inferiore a due mesi) si smura il tubo, si ricercano dei tubuli e dei cespugli ocracei e, ove se ne riscontrino, si mettono nelle boccette a tappo smerigliato.

Siccome poi l'impianto deve rimanere funzionante per così lungo tempo, per maggiore garanzia e sicurezza dell'osservatore, è meglio che le sue varie parti vengano fissate con filo zincato, cui si appongono dei bolli di piombo mercè le tenaglie fissabolli.

Aria.

L'esame microscopico dell'aria è oggidì diretto a ricercare gli elementi costituenti il pulviscolo atmosferico, indipendentemente dagli organismi viventi, muffe, blastomiceti, batteri, i quali si ricercano coll'esame batteriologico.

Volendo esaminare il pulviscolo atmosferico, generalmente si consiglia di esporrre all'aria per un tempo determinato dei vetrini spalmati di glicerina e osservare al microscopio ciò che vi è deposto sopra, facilitando meglio tale ricerca col servirsi di qualcuno dei così detti aeroscopi, per esempio dell'aeroscopio del Pouquet o del Miquel.

Si può però, non possedendo aeroscopi procedere al lavaggio dell'aria o nell'acqua distillata sterilizzata o nel liquido indifferente proposto dal Sanfelice (glicerina al 5 per cento in acqua distillata), o nella soluzione fisiologica di cloruro sodico o in questa stessa con aggiunta di acido fenico all'1 per cento. Il lavaggio si compie facendo passare e gorgogliare l'aria a piccole bolle attraverso una o più provette comunicanti fra loro. Il deposito per l'esame microscopico si facilita mediante la centrifugazione.

L'Arens ha ideato un soffietto di stoffa impermeabile ai gas, della capacità di 5 litri, provvisto all'apertura di un tubo ad Y con rubinetti alle due branche. Si riempie il soffietto, chiudendo uno dei rubinetti situati allo estremo delle due branche del tubo ad Y, lasciando aperto l'altro, e lo si vuota procedendo inversamente. Il filtro consta di un tubo lungo 8-10 cm., del diametro di una provetta e affilato ad una estremità: esso viene riempito di un tampone di ovatta del diametro di 3-4 cm., avendo cura di liberarlo dai peli liberi soffiando e di essiccarlo in un essiccatore ad H_2SO_4. Con questo apparecchio si possono filtrare fino a 200 litri d'aria in tre quarti di ora.

Senza ricorrere al metodo dell'Arens, che nella pratica è alquanto incomodo, si può anche praticare l'esame microscopico dell'aria per la ricerca delle particelle insolubili facendo passare l'aria attraverso ad un filtro di zucchero come quello da me ideato per l'esame batteriologico dell'aria (v. questo vol. *Batteriologia*) e poi, dopo avere aspirati 20-100 litri, sciogliere lo zucchero facendolo pervenire in un recipiente contenente acqua distillata sterilizzata, centrifugare ed esaminare il residuo.

Perchè i risultati siano esatti è consigliabile che il filtro sia tenuto durante l'aspirazione, verticale, e che con un esame di controllo, si sappia bene se nella soluzione zuccherina semplice si trovino elementi eterogenei e se vi sono, non si rifersicano poi all'aria.

Quando si voglia tener conto anche delle particelle solubili, allora si può sostituire il filtro di zucchero con uno di amianto, ed esaminare direttamente al microscopio i primi strati del filtro, facendo una serie di preparati, per esempio in olio di vasellina, in olio di olive o anche addirittura in olio di cedro o balsamo del Canadà o idrato di cloralio, procurando di non mettere sul vetrino portoggetti una grande quantità di materiale.

Qualunque sia la tecnica adoperata, l'esame microscopico dell'aria è assai difficile, perchè la identificazione di tutte le particelle che si riscontrano (sempre indipendentemente da muffe, blastomiceti e batteri) è legata a conoscenze individuali che si acquistano solo con una pratica speciale.

Tutti i costituenti del pulviscolo atmosferico si raggruppano nelle tre categorie di *polveri organizzate, organiche, inorganiche.*

Fra i corpi organici ed organizzati possono trovarsi delle alghe, dei protozoi incistidati, delle uova di elminti, elementi tutti più o meno coartati, alterati e diagnosticabili. Fra i corpi organici si trovano peli, polline, frammenti di corpi organizzati, polveri di pietra, di metallo, di tornitori, di pulitori.

L'Hemund servendosi di apparecchio speciale inventato dall'Aithen, col quale si può avere la misura delle particelle che si librano nell'aria, costituenti il pulviscolo atmosferico, ha trovato che esse nelle grandi città salgono a 400,000 per cmc., mentre nelle campagne si riducono da 6000 a 10,000. Questa polvere non è costituita da granuli relativamente grossi e pesanti che presto ricadono a terra, ma da una polvere invisibile, quasi trasparente, fatta di particelle osservabili solo al microscopio, le quali per la loro leggerezza possono stare a lungo sospese nell'aria, fornando la così detta *nebbia urbana* che in certe ore si osserva al disopra delle città.

In generale si può ritenere che l'esame microscopico dell'aria, inteso nel suo vero senso igienico, ha importanza reale solo per stabilire se l'aria delle fabbriche, ove lavorano molti operai, sia o no dannosa per le molte particelle sospese, che vengono respirate, specie poi se si tratta di particelle a bordi acuminati, taglienti, a sega, ad uncino.

Per raccogliere queste polveri è stato costruito dall'ing. Sedibanero, dietro suggerimento del Recknagel, un apparecchio composto di una pompa

aspirante, capace di aspirare sette litri di aria in 1' (quantità che introduce un uomo in riposo nei polmoni, nello stesso tempo). La pompa è messa in movimento da una batteria di accumulatori. L'aria attraversa un tubo lungo m. 0. 10 e largo alla estremità anteriore cm. 1. 5, oppure 3, a seconda che si vuole un'apertura corrispondente a quella di una narice o di tutte e due. L'estremità posteriore è larga appena 2 mm. Il filtro che si pone nel tubo è lungo cm. 0. 30 e costituito da lana di collodion. Finita la filtrazione si scioglie la lana in alcool-etere od acetone, e si esamina il materiale che vi resta indisciolto. Con questo apparecchio, oltre che ricerche microscopiche sulle polveri si possono fare ricerche ponderali, chimiche, ecc.

Le polveri industriali si distinguono in *metalliche*, *minerali*, *organiche*, *di fibre tessili*.

LE POLVERI METALLICHE sono varie.

La *polvere di ferro* si presenta a grani fini, o lamelle sottili a bordi taglienti, puntuti, grandi mm. 0. 02-0. 25. Mescolata allo smeriglio, si

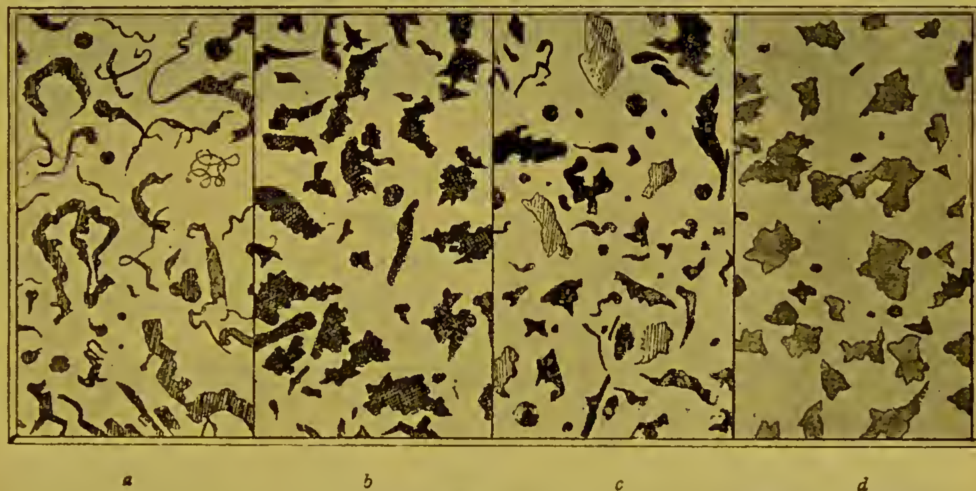


Fig. 257.

presenta poi in elementi finissimi, filiformi, con molti spigoli, anche uncinati (fig. 257 *a-b*).

La *polvere di acciaio* è costituita da grani fini, taglienti, con molti spigoli e punte (fig. 257 *c*): così si presenta appunto nelle fabbriche dove si arrotano gli aghi da cucire.

La *polvere di bronzo e di ottone* si presenta con elementi grossolani a bordi anfrattuosi (fig. 257 *d*): è una polvere molto pesante che difficilmente si inspira.

Lo stesso si dica della *polvere di piombo*, la quale in ogni caso agisce più chimicamente che meccanicamente.

LE POLVERI MINERALI sono moltissime: le più dannose sono le fine a bordi taglienti e leggere. Il Wegmann le ha distinte in cinque gruppi:

cristallizzate (quarzo, smeriglio, calce, schiuma);

cristalline (marmo, gesso, granito, gneiss);

conglomerate (sabbia, smeriglio);
dense (lavagna, cemento);
di porcellana (argilla, scorie, ecc.).

Si tratta naturalmente di polveri ad elementi diversi, a seconda della provenienza, della natura e della consistenza del materiale, ecc.

La *polvere di granito* si presenta a grani di forma lamellare, a bordi assottigliati e taglienti (fig. 258 *a*).

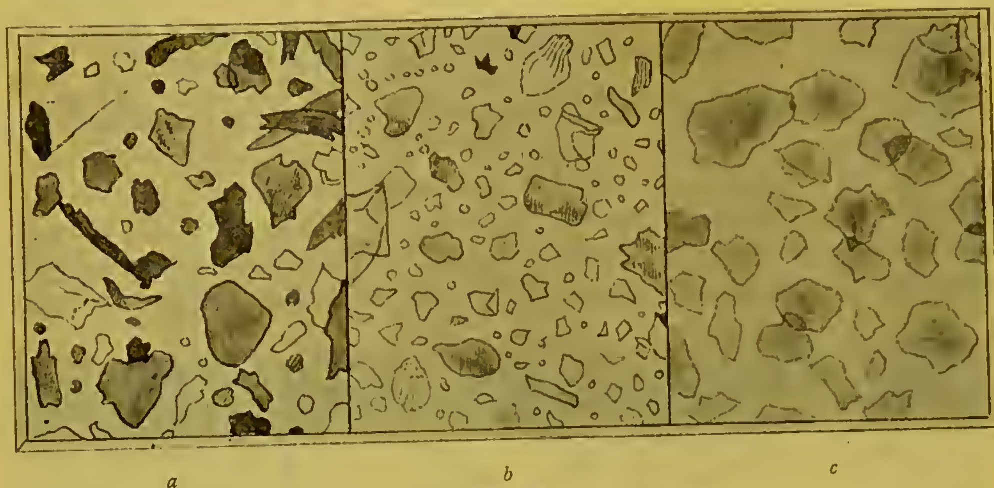


Fig. 258.

La *polvere di sabbia* è costituita da grani cristallini o amorfi avvolti da materiale di altra natura; se il nocciolo del grano è di pietra cristallina, la polvere è ad elementi acuti, taglienti (fig. 258 *b*). In caso contrario è ad elementi rotondeggianti e più o meno angolosi.

La *polvere di quarzo* è a grani tondeggianti, alquanto angolosi, sottili, durissimi, spesso lamellari (fig. 258 *c*).

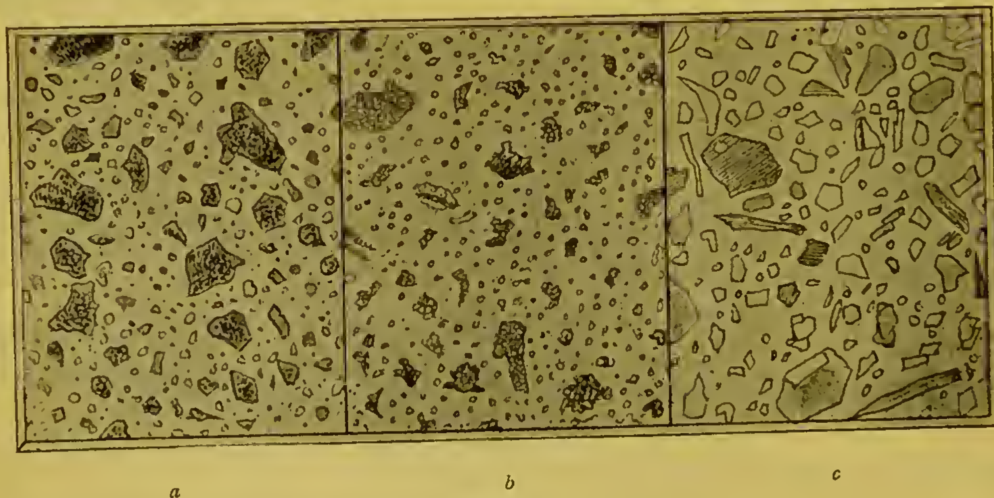


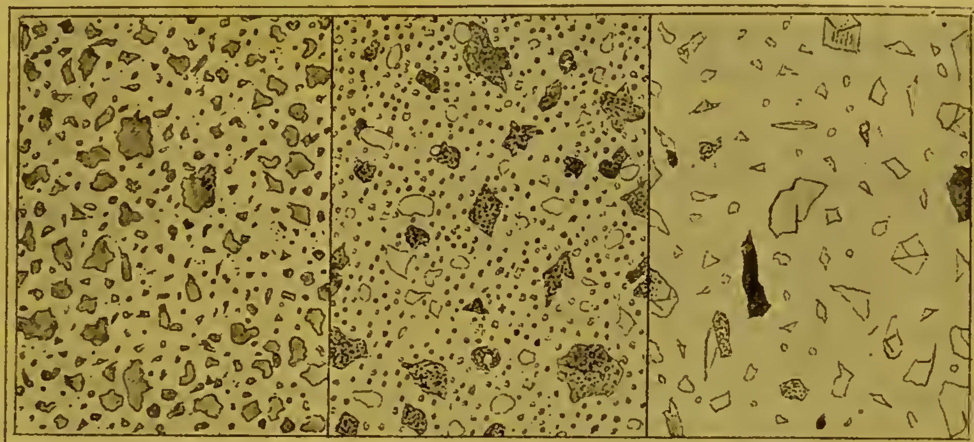
Fig. 259.

La *polvere di calce* è ad elementi più o meno tondeggianti o puntuti, grossolani, fra i quali si trovano elementi fini, piccoli, tondi, costituenti la sostanza di congiunzione (fig. 259 *a*).

La *polvere di schiuma* è rappresentata da grani rotondi, ad ammassi più o meno grossolani o separati (fig. 259 *b*).

La *polvere di gesso* è costituita da elementi fini, sottili, lamellari, spesso a bordi taglienti, di dimensioni variabili, ma generalmente piccole (fig. 259 *c*).

La *polvere di cemento* si presenta sotto forma di grani angolosi, piccoli, fini (fig. 260 *a*), ed è spesso mescolata a quella di calce, che non ha forma speciale; è finissima e fortemente igroscopica.

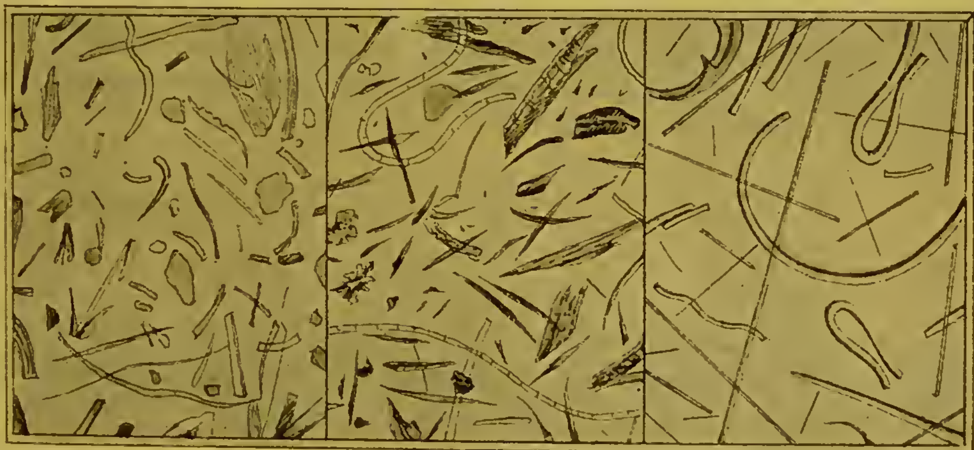


a *b* *c*

Fig. 260.

La *polvere di mattone* si presenta a elementi grossi e fini, rotondi o puntuti e amorfi (fig. 260 *b*).

La *polvere di vetro*, che si trova là dove si macina il vetro, è a elementi fini, taglientissimi, grandi e piccoli, sottili e spessi; è per lo più mescolata con altra polvere più o meno grossolana (fig. 260 *c*).



a *b* *c*

Fig. 261.

LE POLVERI DELLE FIBRE TESSILI hanno caratteri diversi:

Quella di cotone è ricca di frammenti della capsula dei semi, delle foglie, degli steli, tra cui si trovano particelle minerali; *quella di canapa*

(fig. 261 *a*) e *di lino* (fig. 261 *b*) è ricca di elementi legnosi, pezzetti di midollo, peli dello stelo, particelle di corteccia e di elementi più o meno grossolani, in cui appare la tessitura delle fibre, cioè lunghi, stretti, taglienti; *quella di iuta* è ad elementi più grossi, tra cui non mancano mai quelli ad estremi a pennello; *quella di seta* si presenta ad elementi fibrillari in tutto simili a quelli che si osservano nelle fibre dei tessuti; *quella di lana* (fig. 261 *c*) poi, oltre ai frammenti dei peli, è ricca di sudiciume, di frammenti di epidermide; negli ambienti in cui la lana è cardata si trovano molte fibre a pennello, e in quelli dove è colorata, granuli amorfi di sostanze coloranti, ecc.

In alcuni casi, si può però anche essere chiamati a ricercare *se nel pulviscolo atmosferico si trovino germi patogeni.*

Tale ricerca coll'esame microscopico non si può fare. Si può soltanto, a mezzo di preparati colorati, e qualche volta solo ancora, tentare di ricercare il B. della tubercolosi, ma è sempre preferibile anche in questo caso inoculare il materiale nelle cavie.

Per raccogliere i germi dall'aria esistono diversi apparecchi (v. *Batteriologia*) tra cui uno da me ideato a filtro di zucchero unito a una scatola di Rosahegy. Recentemente Richet ha adoperato il suo aerofiltro (cioè una specie di ventilatore elettrico destinato a far passare l'aria in un imbuto bagnato di glicerina o di acqua sulla quale vengono raccolti i germi dell'aria) col quale è riuscito a ricavare dall'aria di sale d'ospedale bacilli streptococchi, ecc. Sta di fatto però che anche la presenza dello stesso B. della tubercolosi è difficilissimo a dimostrarsi persino nell'aria confinata, mentre è relativamente facile trovarlo nella polvere degli ambienti abitati da tubercolosi ove detti germi possono resistere a lungo.

Sono anche stati trovati in queste condizioni il B. del tifo, il paratifo B, il B. della dissenteria, il V. del colera e si è veduto che la loro resistenza può essere notevole: da 24 ore per quella del vibrione colerigeno a 20 giorni per il B. dissenterico, 24 per il paratifo B, 40 per il B. del tifo.

La ricerca e la diagnosi di questi germi non può farsi altrimenti che ricorrendo ai presidii batteriologici.

Suolo.

Come l'esame dell'aria, anche quello del suolo era per l'addietro un semplice esame batterioscopico. In seguito, col progredire della scienza, questo esame si è diviso in microscopico e batteriologico e si è data a quest'ultimo la maggiore importanza.

Esame microscopico. — Alcuni affermano che esso può rivelare la natura minerale del terreno; ma si comprende come sia impossibile possa condurre a un risultato di tal genere. Piuttosto esso serve per studiare tutto ciò che sta attaccato, per dir così, alle particelle del terreno, e che non può essere rivelato dall'esame batteriologico.

La tecnica che viene indicata allo scopo, in genere, è questa: si preleva anzitutto una certa quantità di terreno (da ½ ad 1 cmc.) con un cucchiaino di platino o di altro metallo precedentemente ben sterilizzato e la si stempera con acqua distillata, sterilizzata semplice o contenente del cloruro di sodio (0.75 per cento). Si esamina quindi una goccia del liquido dapprima con un ingrandimento di 100 diametri, e poi con uno maggiore di 400-600 diametri. Però, si comprende di leggieri l'insufficienza di questo metodo, perchè il terreno, se non è bene diviso in finissime particelle, non si può prestare all'indagine microscopica.

Meglio è di porre il terreno prelevato in un matraccio Erlenmeyer, contenente acqua o *NaCl* al 0.75 per cento, sbattere ben bene e poi esaminare l'acqua di lavaggio, sia facendo preparati a fresco, sia a goccia pendente: si viene così ad aver notizia di ciò che è sospeso, e che ordinariamente è costituito da protozoi, alghe ed ifomiceti. Si completa poi l'esame osservando ciò che resta nel fondo del matraccio.

Emmerich propose (a proposito però dell'esame batteriologico) di sbattere da 2 a 5 cmc. di terreno con 50 cmc. di acqua in un recipiente che avesse un fondo concavo e che fosse provvisto di una fine rete metallica a poca distanza dal fondo stesso. Su questa rete si raccoglie il terreno; sotto alla rete e nel fondo concavo si raccoglie l'acqua di lavaggio L'operazione dovrebbe ripetersi una ventina di volte. Però anche così praticando, il terreno resta sempre costituito da particelle grosse che non permettono tanto facilmente l'esame al microscopio.

Io consiglio di triturare prima il terreno in un mortaino di porcellana (previamente sterilizzato col farvi bruciar dentro dell'alcool) per ridurlo in finissima polvere. Una certa quantità di questo terreno va sottomesso poi a quell'operazione che, per analogia a quella che si pratica sugli amidi, chiamerei *levigamento del terreno:* il terreno, cioè, si pone entro un recipiente metallico fatto a guisa di un comune estrattore, costituito quindi da un tubo di metallo diviso a metà da una reticella.

Esso è costituito da due coperchi cilindrici di metallo (fig. 262) dei quali il superiore *A* porta sul fondo un pernio a vite *a* che fa da asse. Questo pernio, nel punto in cui si attacca al fondo, presenta dei fori coi quali comunica coll'esterno per mezzo di un tubo *b* a cui è annesso. A questo si innesta un tubo di gomma che porta un tubo di vetro con una dilatazione in cui si pone del cotone.

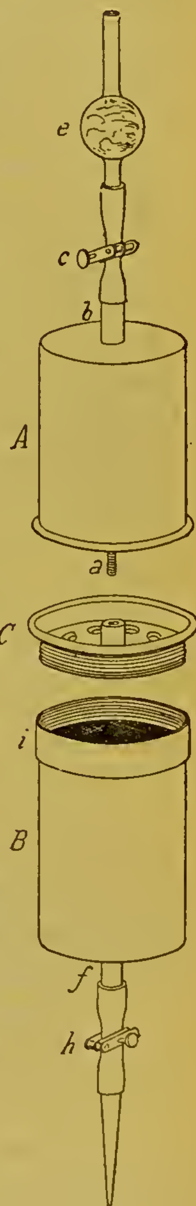


Fig. 262.

Il cilindro inferiore *B* porta al fondo soltanto un tubo esterno *f* che si congiunge con un tubo di gomma *h* stringibile con una morsetta, nel quale è innestato un tubo di vetro a punta. Al bordo di questo cilindro è adattato un cerchio *i* portante nell'interno una scanalatura, su cui si fa poggiare un fitta rete metallica *z* che viene compressa contro la scanalatura da un disco metallico forato *c* che si avvita entro il cerchio stesso *i*.

Questo disco metallico *C* nel suo centro è poi fornito di una madrevite, entro la quale si avvita l'asse *a* del cilindro superiore *A* per chiudere l'apparecchio.

Tra i bordi piani del disco metallico e quello del cilindro superiore *A* si può collocare un anello di gomma per maggior garanzia di chiusura.

Tutto l'apparecchio, a pezzi separati, si sterilizza nella stufa di Koch una prima volta e poi una seconda mettendo a posto il retino e il disco forato, avvolgendoli in carta bibula.

Al momento di doverlo adoperare si svolge il recipiente dalla carta bibula, si pone sul disco forato il terreno (triturato in un mortaio sterilizzato, tenuto coperto con un cappuccio di gomma), su questo si versa quella quantità di acqua distillata sterilizzata che si crede sufficiente (50 cmc.) e poi si avvita il recipiente superiore. Va da sè che le pinzette *c*, *h*, annesse ai due tubi di gomma, debbono essere strette.

Indi si sbatte bene, poi si svita la pinzetta superiore *c* e dopo avere collocato sotto al tubo tirato a punta un recipiente sterilizzato si apre l'inferiore *h*. Il liquido passerà così nel recipiente.

Si ripete l'operazione 4-10 volte proteggendo tra un intervallo e l'altro la punta di vetro entro un tubo da saggio sterilizzato.

L'ultima volta, aperto il rubinetto inferiore, l'acqua di lavaggio si fa uscire e si raccoglie in un bicchiere a calice. Appena formatosi un piccolo deposito, si decanta in un altro bicchiere e così via in un terzo e in un quarto, esaminando poi il deposito che si viene a formare in ciascun bicchiere prelevandolo con pipetta sterilizzata.

In quanto ai materiali che costituiscono il reperto dell'esame microscopico del suolo, rimando all'esame microscopico dell'acqua.

ESAME MICROSCOPICO DEI TESSUTI, DELLE PELLICCERIE E DELLA CARTA.

Tessuti.

I tessuti sono formati di quelle sostanze che si riducono in fini elementi suscettibili di intreccio, e che prendono il nome di *fibre tessili*. Queste presentano caratteri abbastanza distinti tra di loro in modo da esser possibile di risolvere i seguenti quesiti:

1° quali siano le fibre tessili che compongono un tessuto:

2° se un tessuto sia formato da fibre tessili nuove o provenienti da tessuti usati.

I. Esame microscopico per riconoscere quali siano le fibre tessili che compongono un tessuto. — Le fibre tessili più usate in commercio sono:

1° *Fibre vegetali*, rappresentate da:

a) cotone (peli dei semi di vari *gossypii*);

b) canapa (fibre del legno della *Cannabis sativa*);

c) lino (fibre del legno del *Linum usitatissimum*);

d) juta (fibre del legno di alcuni *corchiuri*);

e) ramiè, chinagras (fibre dei ramoscelli della *Urtica nivea*).

2° *Fibre animali*, rappresentate da:

a) lana (peli generalmente di ovini e caprini);

b) seta (secreto delle glandole della *Bombyx mori* e di altre specie selvatiche di *Bombyx*, di *Attaccus*, di *Antheria*, ecc.).

Per riconoscere di quali di queste fibre tessili sia formato un tessuto, si procede allo esame microscopico, microchimico e polariscopico.

Il materiale si ottiene dilacerando un po' di tessuto e osservando senz'altro in acqua glicerinata, salvo il caso in cui si tratti di filati o tessuti colorati od apparecchiati, poichè bisogna innanzi tutto far bollire il materiale (per privarlo del colore e dall'apparecchio) in acido cloridrico al 3-5 per cento o in altri liquidi (soluzione di cloro, acido cromico diluito, carbonato potassico al 2-3 per cento); sarà utile anche lavare prima il materiale in etere, allorchè si tratta di tessuti sudici o grassi.

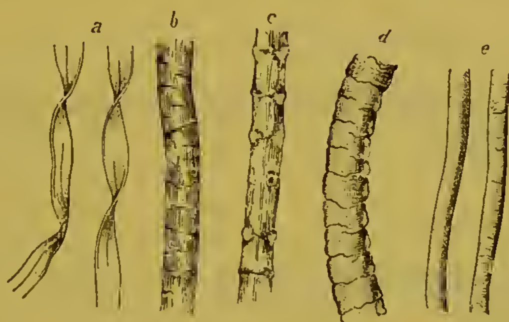


Fig. 263.

L'*esame microscopico* permette di riconoscere le singole fibre tessili che compongono un tessuto, tenendo presenti i caratteri riguardanti la loro forma, il loro aspetto, la presenza o no di un lume centrale, il modo di presentarsi degli estremi, ecc., come si può rilevare dalla tabella seguente:

TABELLA 93.

Caratteri morfo

Nome delle fibre tessili	Forma e aspetto	Lume centrale
Cotone (fig. 262 *a*)	Elementi generalmente appiattiti, nastriformi, attorcigliati a spira: possono però trovarsene di quelli per lungo tratto cilindrici e simili alle fibre di lino	Nelle qualità scadenti (indiane) quattro volte più grande dello sore delle pareti, nelle fine (a cane ed egiziane) ristretto. In cuna può anche mancare (fibr mature tendenti alla forma drica)
Canapa (fig. 262 *b*)	Elementi cilindrici con rigonfiamenti qua e là poco appariscenti	Abbastanza ampio, terminante ve punta della fibra in una line pena visibile
Lino (fig. 262 *c*)	Elementi cilindrici, trasparenti, con rigonfiamenti a canna di bambù	Esilissimo, appena come una line lognola
Juta	Elementi cilindrici spesso uniti a fasci	Lume ampio, e qua e là delle st ture
Ramiè	Elementi cilindrici simili alle fibre di juta	Lume assai ampio . . . .
Lana (fig. 262 *d*)	Elementi cilindrici costituiti di: 1º uno strato epidermico di cellule disposte a embrice (che manca nelle lane molto lavorate, nelle ungheresi, nei merinos); 2º di uno strato corticale costituito da fibrille giustapposte; 3º da uno strato midollare di cellule poligonali (che nelle lane bianche si presenta come una linea oscura), il quale nelle migliori lane deve essere appena visibile	
Seta (fig. 262 *e*)	Elementi quasi perfettamente cilindrici, lucenti, omogenei senza alcuna striatura (questa però si trova nelle sete esotiche e l'acido cromico la rende anche più manifesta), dritti, regolari (alcune sete esotiche soltanto presentano i fili avvolti a spirale)	Siccome ogni filamento è costitu due metà giustapposte, il pu unione delle due metà a volt rassomigliare ad un lume

singole fiore tessili.

Caratteri speciali degli estremi	Caratteri speciali lungo il percorso della fibra	Dimensioni e rapporto tra la lunghezza e il diametro
ralmente terminano con una tremità a punta arrotondita iiforme e coll'altra tronca o lacciata	Allo stato greggio rivestite di una cuticola che è insolubi.e nel reattivo di Schweitzer	Variabile: per lo più spesse 12-14 μ e lunghe 10-40 mm.
mi arrotondati, a volte con ramazioni laterali	Rigonfiamenti o nodi lungo il percorso	Larghe 2? μ e lunghe 15-25 mm. Rapporto della lunghezza al diametro circa 1000.
mi a punta	Idem ma molto più pronunciati: le fibre sono striate longitudinalmente	Larghe 10-26 μ e lunghe 23-30 mm. Rapporto della lunghezza al diametro circa 1200.
mi a punta arrotondata o irgolare	Senza striatura longitudinale nè nodi	Larghe 20-25 μ e lunghe 1.5-5 mm. Rapporto della lunghezza al diametro 90.
mi arrotondati difficilmente riovabili	Striate longitudinalmente; con nodi e striature trasversali	Larghe 40-80 μ e lunghe 65-250 mm. Rapporto della lunghezza al diametro 2400.
		Larghe 15-40 μ e lunghe 40-200 mm.
		Larghe 8-24 μ e lunghe 350-1250 mm.

Tenendo presenti i caratteri microscopici delle singole fibre, si possono svelare le frodi, che sono assai comuni in commercio, consistenti nel fabbricare tessuti di lana o di seta, mescolando a queste, altre fibre tessili, per es. di cotone.

L'*esame microchimico* dei tessuti si pratica trattandoli con diversi reagenti, che in massima servono a far distinguere le fibre animali dalle vegetali, cioè:

a) con iodio ed acido solforico, o più semplicemente con il cloroioduro di zinco: *le fibre vegetali contenenti cellulosa* assumono una colorazione violetta, mentre le animali assumono una tinta gialla;

b) con una soluzione cupro-ammoniacale o reattivo di Schweitzer; *le fibre vegetali contenenti cellulosa* si disciolgono più o meno rapidamente, fatta eccezione di quelle che contengono la suberina, le quali poi resistono anche all'acido solforico ed agli alcali;

c) col solfato di anilina, *le fibre vegetali contenenti lignina* assumono una colorazione giallo-oro che non è assunta dalle fibre animali;

d) cogli acidi: l'acido solforico ed il nitrico al 25 % non disciolgono alcuna fibra vegetale, nè impartiscono loro colorazione alcuna, mentre colorano in giallo le fibre animali; l'acido picrico colora in giallo fibre vegetali e fibre animali; però con il lavaggio successivo nell'acqua le fibre vegetali si scolorano, mentre le animali rimangono colorate;

e) con gli alcali: la potassa al 10 %, anche bollente, non dissolve le fibre vegetali, mentre invece dissolve le fibre animali;

f) colle sostanze coloranti, aniliniche, mentre le fibre vegetali assumono piuttosto stentatamente i colori di anilina, le fibre animali li assumono facilmente;

g) con reattivi speciali: il reattivo di Nylander impartisce un caratteristico colorito nero alla lana per la combinazione dello zolfo che essa contiene, col bismuto del reattivo, essendo questo formato da sale di Seignette gr. 4, soluzione di idrato sodico al 9 % gr. 100, sottonitrato di bismuto gr. 2.

In genere i procedimenti che si adottano sono i seguenti (Nasini e Villavecchia):

1° *Per distinguere le fibre animali* (*lana, seta*) *da quelle vegetali* (*canapa, cotone, lino, ramiè*, ecc.):

a) accendendo ad una fiamma le fibre isolate od in piccoli fascetti, quelle animali bruciano svolgendo fumi con odore di corna bruciate e con reazione alcalina, e lasciano un carbone spugnoso e pesante, che dà un residuo abbondante di ceneri; le vegetali, invece, bruciano con fiamma viva, spandono fumi di odore empireumatico con reazione acida, e lasciano un carbone che dà poche ceneri;

b) la soda o la potassa all'8 per cento a caldo, sciolgono le fibre animali, lasciano quasi intatte le vegetali,

c) l'acido nitrico colora la lana e la seta in giallo e lascia scoloriti il cotone e il lino.

Ricorderò anche il metodo del Vétillard per distinguere le varie fibre vegetali, fondato sull'esame microscopico delle fibre in direzione longitudinale e in sezione trasversale, e sulla colorazione con l'iodio e coll'acido solforico diluito (vol. 3 H_2SO_4 a 60° + vol. 2 glicerina + vol. 1 acqua distillata). Con questo trattamento l'A. ha distinto le fibre in due gruppi, a seconda che si colorano in azzurro (lino, canapa, cotone) o giallo (juta), e ha trovato altre particolarità sulle quali non insisto.

2° *Per distinguere le fibre di seta da quelle di lana:*

a) trattando le fibre con potassa caustica e sciogliendole con nitroprussiato di soda, si avrà una colorazione violetta se vi è lana, nessuna colorazione se vi è seta;

b) trattando le fibre a freddo con il reattivo di Schweitzer si scioglieranno le fibre di seta, non quelle di lana;

c) trattando a caldo le fibre con cloruro di zinco basico le fibre di seta si sciolgono, mentre quelle di lana vengono attaccate solo debolmente.

3° *Per distinguere le fibre di lino da quelle di cotone:*

a) trattando il tessuto con acqua leggermente acidulata e poi lavando con acqua ammoniacale, le fibre di cotone si staccheranno rimanendo quelle di lino a formare lo scheletro della tela;

b) immergendo la tela, priva dell'apparecchio e del colore, nell'olio di oliva, e poi spremendo l'eccesso d'olio ed osservando per trasparenza, le fibre di cotone appariranno bianche ed opache, mentre le fibre di lino appariranno translucide.

L'*esame polariscopico* può essere utile in alcuni casi: per esempio per assicurarsi se un tessuto sia composto di fibre di juta o di lino o di ambedue.

All'uopo si scaldano le fibre con acido nitrico ordinario cui si aggiunge una traccia di clorato potassico, si lava con acqua pura e poi con acqua alcalinizzata con potassa per neutralizzare l'acido trattenuto nelle fibre; si decanta il liquido e si agitano le fibre con altra acqua pura. Così le fibre si dissociano e possono osservarsi ponendole, ancora umide, sopra un vetro portoggetti, lasciando evaporare il liquido e aggiungendo una goccia di glicerina.

In tali condizioni le fibre non solo lasciano apparire in modo nettissimo l'ispessimento caratteristico delle pareti, ma permettono il saggio alla luce polarizzata. Collocando il preparato fra i due prismi di nicols incrociati del micropolarizzatore ed osservando ad un ingrandimento di 600 diametri, si nota che mentre le fibre di lino e canapa presentano dei bellissimi effetti luminosi, quelle di juta mostrano un colore sensibilmente uniforme, azzurrognolo o giallastro: questo però naturalmente non avviene che per le fibre completamente dissociate, giacchè con le fibre aggregate e sovrapposte si ottengono dei fenomeni luminosi e complessi, analoghi a quelli del lino (Revelli).

II. Esame microscopico per riconoscere se un tessuto sia formato da fibre tessili nuove o provenienti da tessuti fuori di uso. — I vecchi tessuti di lana mescolati con lana nuova e anche a

volte con seta, lino e cotone, opportunamente lavorati, costituiscono la così detta lana rigenerata, artificiale, meccanica o *shoddy*.

Riconoscere qualitativamente nei tessuti di lana rigenerata le fibre che non siano di lana è facile, ricorrendo agli ordinari metodi di indagine, di cui si parla nel paragrafo precedente. Riconoscere invece, in un tessuto di lana, se le fibre di lana siano di lana nuova o di lana rigenerata, è cosa alquanto più difficile, e basata quasi unicamente sull'esame microscopico.

Con questo infatti si rileva (Revelli):

1° che le fibre di lana rigenerata che si trovano in un tessuto, si presentano generalmente di tinte molto diverse, ciò che dimostra non essere state colorate con lo stesso processo, ma diversamente, a seconda dei tessuti dai quali provengono;

2° che le fibre di lana rigenerata non sono così regolari come quelle della lana nuova, perchè si restringono a poco a poco, o tutt'a un tratto, poi di bel nuovo si dilatano in una espansione, per ancora restringersi o mantenersi regolari per un certo tratto; in molti punti le scaglie sono andate perdute; in altre il pelo è guasto, di guisa che il diametro diventa minore del normale, nè è raro si riduca a 10 μ e anche meno; gli estremi dei singoli fili si presentano troncati in modo brusco e irregolare, mentre nella lana nuova terminano in fibrille ondulate ed esilissime;

3° che le fibre di lana rigenerata, trattate con lisciva di soda o potassa, vengono intaccate e gonfiate più rapidamente che quelle di lana nuova, e che l'acido solforico concentrato distrugge la struttura primitiva del pelo della lana rigenerata molto più rapidamente che quella del pelo della lana nuova.

Per procedere a queste ultime ricerche. occorre seguire il metodo dello Schlesingen: cioè, collocare a croce sul portoggetti un pelo di *shoddhy* e un pelo di lana nuova filata: quindi lavatala e spogliatala del sudiciume e della materia grassa, far venire in contatto con le due fibre il reagente, notando il momento in cui esso tocca i peli. Si mette quindi il coproggetti e si osserva al microscopio ad un ingrandimento di 65 diametri.

Quanto poi a riconoscere in un tessuto, in cui si sia dimostrata la presenza di lana rigenerata, la quantità di quest'ultima, bisogna ricorrere alla numerazione delle fibre stesse, calcolandone il rapporto con quelle della lana nuova; il numero delle fibre da contare non deve essere inferiore a 1000.

Pelliccerie.

Coi peli di vari animali sono formati gli oggetti di pellicceria, salvo quelli che sono fatti con le piume degli uccelli.

L'esame microscopico delle pelliccerie si pratica:

1° per riconoscere se gli articoli siano realmente fatti con peli e non

con fibre tessili o con piume, al che si procede coi metodi di indagine microscopica già indicati per i tessuti;

2° per riconoscere da quale animale provenga il pelo.

All'uopo si trattano i peli con acqua alcoolizzata, si passano in soluzione diluita di carbonato sodico, si lavano e si osservano tenendo presenti quei caratteri che sono stati indicati per i vari peli.

Per esempio, se si tratta di *zibellino*, si troveranno peli con il canale midollare molto visibile, con un'embricatura che agli orli estremi del pelo è marcatissima, e con gli estremi che hanno una specie di striatura dovuta alle scaglie epiteliali.

Se si tratta di *lontra* si troveranno peli con il canale midollare che presenta dei restringimenti in contatto della parte corticale, e con un aspetto molto granuloso, delle scaglie grandi, degli estremi solcati da strie, ecc.

Carta.

L'esame microscopico della carta ha per oggetto di stabilire:

1° di quali fibre la carta sia costituita;

2° se le fibre contengano conglobate delle sostanze eterogenee.

1. *L'esame microscopico per riconoscere di quali fibre sia costituita la carta*, si fa per stabilire se nelle carta si trovino fibre legnose in genere, perchè queste, nella carta destinata a conservarsi a lungo, vanno considerate come una sofisticazione, essendo una delle cause principali di deterioramento.

All'uopo si fanno bollire frammenti di carta in soda all'1-2 per cento, nei casi più ordinari, ovvero si tratta prima la carta con acqua e alcool, se si sospetta la presenza della lana, o anche con acqua sola, quando si tratti di carta non incollata. Poscia si passa il materiale attraverso un setaccio a maglie finissime, si lava ciò che rimane sul filtro con molta acqua e si pone in una capsula di porcellana, aggiungendo una piccola quantità di acqua. Si agita sino a ottenere l'isolamento delle singole fibre che, poste sul vetro portoggetti, ed esaminate, potranno subito essere riconosciute per le fibre tessili che ordinariamente usansi nella confezione dei tessuti, ovvero per altri materiali vegetali, che con esse non hanno relazione.

La ricerca, del resto, può essere facilitata procedendo a diverse reazioni anche sotto il campo microscopico, poichè si sa:

a) che con una soluzione iodo-iodurata glicerinata (gr. 1.15 di iodio, gr. 2 ioduro di potassio, 1 cmc. di glicerina, gr. 20 d'acqua), le fibre di legno e di juta si colorano in giallo; la paglia e lo sparto rimangono incolori; il cotone, il lino, la canapa si colorano in bruno;

b) che con l'iodio e l'acido solforico si ottiene uno colorazione bleu della cellulosa pura, gialla del legno. verde delle cellule meno lignificate;

c) che con la fluoglurina e l'acido cloridrico, si ha una colorazione più o meno rossa delle pareti lignificate, mentre la cellulosa rimane inalterata, ecc.

2. L'*esame microscopico per riconoscere se le fibre contengano conglobate sostanze eterogenee*, può mettere, per es., in evidenza dell'amido. Bisogna però badare di non confondere l'amido della carta con quello della colla che si dà alle carte par farle aderire ai muri. Si possono anche ricercare polveri minerali (argilla, creta, gesso, solfato di bario), ricordando che solo fino a un certo punto queste possono essere rivelate dal microscopio. La ricerca di sostanze nocive alla salute, per esempio dell'arsenico, non entra nell'esame microscopico. Ricorderemo però che si pratica (metodo biosintetico del Gosio) innestando in un pezzetto di patata sterilizzata un po' della carta, e poi seminando sulla patata il *Penicillium brevicaule*. Se evvi arsenico, si noterà un caratteristico odore di aglio, il quale è dovuto alla arsina dietilica il cui potere tossico è molto elevato e spiega i casi di avvelenamento per arsenico verificatisi in coloro che hanno abitato camere con tappezzerie arsenifere.

Il procedimento è straordinariamente sensibile: basti dire che serve per scoprire dosi di arsenico aggiunte ai substrati nutritizi in proporzione dell'1:10,000,000.

Oltre al *Penicillium brevicaule* possono produrre fenomeni di biosintesi sull'arsenico (come sul tellurio e sul selenio) l'*Aspergillus glaucus*, il *virens*, una varietà di *Mucor mucedo* e qualche altra muffa.

(Finito di stampare il 7 luglio 1911.

G. ALESSANDRINI

PARASSITOLOGIA.

PARASSITOLOGIA.

PARTE I.

GENERALITÀ.

È molto frequente in natura il caso in cui vari esseri si riuniscano per condurre vita in comune, sia per la propria difesa, sia per procurarsi più agevolmente il cibo, costituendo le associazioni animali o *simbiosi*.

Queste possono essere formate o da individui appartenenti alla stessa specie (*associazioni omonime*) costituendo in tal guisa *colonie* e *società;* oppure da individui che fra di loro non hanno alcun vincolo di consanguineità ed appartengono a gruppi animali più o meno distanti fra loro (*associazioni eteronime*). Si sono costituite varie categorie di queste ultime associazioni, sebbene una distinzione netta fra di esse non esista, nè possa farsi, giacchè il più delle volte si compenetrano l'un l'altra e da una forma si giunge a quella vicina con un graduale, lieve e quasi inavvertibile passaggio.

Però, per formarsi un'idea di queste varie forme di associazioni eteronime, darò brevemente un cenno di quelle categorie che dai più sono ammesse:

L'*Epocumenismo* (1) nel quale si comprendono quegli animali che domandano ospitalità, soccorso, ad altro animale solo per il passaggio da un luogo ad un altro senza essere ad esso menomamente molesto o dannoso.

Abbiamo bellissimi esempi di *Epocumeni* in quei crostacei (*Cirripedi*) che, privi di organi di locomozione, si attaccano alle grosse testuggini marine, ai grossi cetacei, come alle chiglie delle grosse navi col solo scopo di farsi trasportare per provvedere con più facilità al proprio sostentamento.

Sono *Epocumeni* le giovani aringhe che si riparano dentro il mantello delle meduse ove penetrano anche per difendersi dai nemici.

È un Epocumeno anche quel piccolo pesce che va col nome di *Fermavascello*, il quale, quasi inetto al nuoto, aderisce, con una specie di ventosa che ha sulla testa, al ventre dei pesci-cani, delle balene, alla chiglia delle stesse navi per andare, mercè loro, alla ricerca del cibo.

(1) ARIOLA. *Simbiosi e parassitismo nel regno animale.*

Commensalismo. — In questo caso il simbionte non si contenta del solo trasporto e di nutrirsi del solo cibo che può capitargli in bocca, ma, spinto dal desiderio di assicurarsi un pasto più abbondante e variato, cerca di sottrarne al vicino, sia pure in una piccola quantità per questo superflua.

Possiamo considerare come esempio lo stesso pesciolino quando, non contento di aderire al ventre dell'ospite, va a fissarsi nella sua cavità boccale e precisamente sul palato dello stesso pesce-cane, il quale, data la straordinaria voracità, non risente alcun danno per il superfluo che può sottrargli il compagno, mentre questo solo ricaverà un profitto dalla associazione divenendo un vero e proprio commensale.

Mutualismo. — Se però i due esseri associati si rendono reciprocamente dei servigi, ed ognuno di essi trae un utile dalla convivenza, ci troveremo innanzi ad un caso di *mutualismo.*

Chiamiamo infatti mutualista la *Cheyletiella parasitivorax* (Mégn.) che, vivendo in mezzo al pelame dei conigli, quasi in cambio dell'ospitalità che le vien concessa, cerca e si nutre di un altro Acaro, il *Listrophorus gibbus* Pag., il quale vive da vero parassita su di essi. Un altro esempio di mutualismo, citato da molti autori, è quello che ci vien dato da quei crostacei che vanno col nome di Bernardo l'eremita.

Essi, avendo l'addome molle, si trovano esposti più che altri alle insidie dei nemici. Per rendersi invulnerabili vanno in cerca di gusci vuoti di molluschi univalvi e di preferenza fanno cadere la scelta su quelli ai quali si sono fissati altri animali marini: le *Attinie* (*Adamsia Rondeletii*). Da questa convivenza nasce un utile indiscutibile ai due simbionti. L'attinia, per sua natura immobile e che vive fissa agli scogli del mare, è trasportata in giro dal compagno, di guisa che trova un nutrimento più facile, più abbondante e più variato; il Paguro, per suo conto, approfitta delle proprietà di cui gode la compagna. Questa infatti all'apice dei tentacoli che circondano la bocca possiede delle cellule urticanti, con le quali mentre uccide i piccoli animali che giungono alla sua portata e dei quali si cibano volentieri entrambi gli associati, tiene lontani i nemici comuni.

Parassitismo. — Può darsi però che un essere debole, il quale nella lotta per l'esistenza si è dimostrato impotente a resistere, non si limiti a ricercare aiuto o protezione ma, *dimorando temporaneamente o permanentemente sul corpo o nel corpo di un altro essere più forte di lui, viva alle sue spese e lo danneggi, alterando e sottraendo quei materiali nutritivi che questi aveva accumulato ed elaborato per proprio uso e sostentamento.*

In tal caso siamo dinnanzi a quella forma di associazione cui si dà il nome di *parassitismo* e del quale dobbiamo di proposito occuparci.

E cominciando dalla definizione diremo:

1° Parassita è un essere organizzato che passa una parte o la totalità della propria esistenza sopra un altro essere organizzato, più forte di lui, alle spese del quale vive e si nutre. (Railliet).

2° Vi è parassitismo quando individui diversi si aggregano a formare un complesso non equilibrato. (Monticelli).

3° Il parassitismo è quella simbiosi in cui uno dei contraenti vive a spese dell'altro senza rendergli servizio, ma recandogli qualche danno. (Ariola).

4° Il parassitismo è una simbiosi antagonista in cui uno solo degli associati trae profitto dalla riunione il più delle volte con danno dell'altro.

Divisione. — Possiamo riscontrare dei parassiti tanto nel regno vegetale (*fitoparassiti*) quanto nel regno animale (*zooparassiti*): ma nè in botanica nè in zoologia essi costituiscono una categoria naturale giacchè nella stessa classe, nello stesso ordine e famiglia noi possiamo avere individui che vivono allo stato parassitario mentre altri conducono vita perfettamente libera e possiamo anche vedere che nella stessa specie le sole femmine vivono parassite; nè mancano casi in cui questo stato si richiede per una sola fase di vita. In ogni modo si può affermare che i parassiti appartengono tutti a tipi inferiori, e nel regno animale noi dobbiamo ricercarli solo fra i Protozoi, i Vermi e gli Artropodi.

Natura del parassitismo. — Vi sono alcuni esseri che vivono indifferentemente tanto in mezzo alle sostanze organiche in decomposizione, quanto in un organismo vivente. Così vediamo alcune larve di mosca (*Calliphora, Sarcophaga, Piophila,* ecc.) che possono riscontrarsi parassite dell'uomo, sia in cavità naturali sia nella cute, e viverci ugualmente bene come vivrebbero sulla carne putrefatta, sul formaggio, sulle feccie. In questo caso noi parliamo di parassitismo *facoltativo*; mentre lo chiamiamo *obbligatorio* o *necessario* quando, per il completo ciclo di sviluppo, si richiede, sia pure per un periodo limitato, necessariamente la condizione di vita parassitaria.

Ma questa obbligatorietà può offrirci delle gradazioni molto svariate e tali che non è sempre facile stabilirne una netta demarcazione.

Vi sono infatti alcuni parassiti nei quali l'obbligatorietà si estende a tutta la durata della vita, altri ad un solo periodo della loro esistenza; alcuni possono indifferentemente variare di ospite, altri non l'abbandonano più quando abbiano una volta fissata su di lui la propria dimora.

Numerosi sono gli esempi di parassiti che cercano la vittima solo per procurarsi il cibo, menando poi sempre vita libera; nè scarsi sono i casi di esseri animali che vivono allo stato parassitario o solo durante il periodo embrionale o larvale, o solo durante il periodo larvale ed adulto, o solo durante quello adulto.

Dato quindi un modo così svariato di comportarsi, credo opportuno riunire nella tabella seguente le varie gradazioni del parassitismo:

- **Parassitismo**
  - **Facoltativo** — Larve di mosca: *Sarcophaga*, *Piophila*, *Calliphora*, *Lucilia*, ecc.
  - **Necessario od obbligatorio**
    - **Continuo** tutta la vita allo stato parassitario
      - *Stazionario*. Quando non abbandonano mai l'ospite sul quale una volta siano giunti. Es. Elminti (*Tenie*, *Ascaridi*, *Ossiuridi*)
        - *con migrazioni*: Tenie, Filarie, ecc.
        - *senza migrazioni*: Ascaridi, Ossiuridi, Tricocefali
      - *Errante*. Quelli che possono passare attivamente o passivamente da un ospite all'altro. Es. Pediculini, Acari, ecc.
    - **Transitorio** una sola parte della vita parassitaria
      - *Intermittente*. Quando vanno nell'ospite solo a prendere il cibo, poi menano vita libera. Es. Tafani, Zanzare, Sanguisughe, Cimici, ecc.
      - *Periodico*
        - con embrioni e larve libere - adulti parassiti: Strongili, Anchilostomi, Pulci, Sarcopsilla
        - con embrioni liberi - larve e adulti parassiti: Distomi, Botriocefali
        - con adulti liberi - embrioni e larve parassiti: Estri, Dermatobie

Sede. — Possiamo riscontrare dei parassiti che vivono liberi alla superficie del corpo, altri invece che si riscontrano nei tessuti o negli organi. Nel primo caso avremo i parassiti *esterni*, *cutanei*, *ectoparassiti*, *dermatozoi*, *epizoi*; nell'altro i parassiti *interni*, *endoparassiti* od *endozoi*.

Tutte le parti del corpo possono esser sede di parassiti, e possiamo riscontrarne in tutti i tessuti, organi e sistemi. Il loro *habitat* può essere molto ristretto come ad esempio la *Spiroptera megastoma* che non vive altro che nel cul di sacco destro dello stomaco dei cavalli; il *Coenurus cerebralis* che vive solo nel cervello dei ruminanti; lo *Strongylus filaria* nel polmone delle pecore; l'*Eustrongylus gigas* solo nel rene; altri invece possono riscontrarsi indifferentemente in più ospiti e nello stesso ospite in organi o tessuti svariati: così l'*Echinococco*, che si riscontra tanto nell'uomo come negli animali domestici, può trovarsi nel fegato, nel polmone, nel cervello, nei reni, nelle sierose, nelle ossa.

Generalmente ogni parassita ha però un ospite proprio, ed in questo una sede di predilezione normale e direi quasi esclusiva, però possono riscontrarsi in sedi anormali come anche in un ospite non adatto e che non conviene perfettamente al proprio sviluppo. Chiameremo quindi *parassita erratico* quello che trovasi in un organo o in una regione non propria, *parassitismo accidentale* quando il parassita, proprio di un animale, può riscontrarsi in un altro ospite. Mentre denomineremo *pseudo parassiti* quelli che, pur conducendo vita libera, possono riscontrarsi, per una accidentalità, in un ospite, menando per qualche tempo vita parassitaria o quasi.

In generale i parassiti adulti vivono sempre in organi o sistemi che hanno una comunicazione diretta od indiretta con il mondo esterno (Tenie, Distomi, Nematodi, ecc.) mentre nello spessore dei tessuti ed in cavità chiuse vivono le forme larvali (Echinococchi, Cisticerchi, larve di Trichina, ecc.). Esistono però delle eccezioni a questa regola, cosicchè noi vediamo che la Bilarzia adulta e varie specie di Filarie vivono o nei vasi sanguigni o nei linfatici o nei tessuti profondi, che non hanno certo comunicazione diretta con l'ambiente esterno.

Influenza della vita parassitaria. — L'adattamento all'ambiente ed al nuovo genere di vita apportano nei parassiti modificazioni che alle volte possono essere sostanziali, tanto che occorre uno studio accurato e profondo e una conoscenza esatta delle loro abitudini e della loro biologia per poter dar loro un posto giusto nella sistematica.

Queste modificazioni possono essere anatomiche e biologiche e saranno tanto più accentuate quanto più accentuato è il grado di parassitismo. Così mentre nelle *Cimici*, che sono parassiti intermittenti, troviamo *atrofia* solo degli organi del volo, nelle *Tenie* in cui il parassitismo è continuo e stazionario vediamo che non si atrofizzano solamente organi ma anche sistemi. In queste infatti si perde ogni traccia del sistema digerente, divenuto inutile dal momento che esse si trovano in un ambiente ove le sostanze nutritive già elaborate passano nel loro orga-

nismo per osmosi e vengono facilmente assimilate. Con l'atrofia del sistema digerente, non avendo più funzioni speciali, spariscono anche tutti gli organi che sarebbero stati necessari alla prensione, si atrofizzano gli organi di senso specifico, rimanendo solo gli elementi necessari alla sensibilità generale.

Ma se da una parte scompaiono o si riducono degli organi, notiamo dall'altra la *comparsa di organi nuovi*, oppure la *modificazione di organi* preesistenti. Sono infatti conseguenza dell'adattamento alla vita parassitaria tanto l'apparizione delle ventose, degli uncini, dei botridi nei Cestodi, quanto le profonde modificazioni che subiscono gli organi boccali degli insetti, i quali, originariamente atti soltanto a succhiare, divengono poi pungenti (Pulci, Tafani, Zanzare, ecc.).

Ma una delle più importanti modificazioni vediamo sorgere nel sistema riproduttore. In molti casi, essendo la diffusione degli esseri affidata al puro caso, potrebbe darsi che gli individui maschi non venissero a trovarsi insieme alle femmine: da ciò ne deriverebbe col tempo l'inevitabile estinzione della specie. Ma a ciò pon riparo o la strabocchevole produzione di uova o l'insorgere dell'ermafroditismo così frequente in molti parassiti, od anche il succedersi delle due generazioni: la sessuata e l'agamica.

Ed ecco che dalle modificazioni di carattere puramente anatomico passiamo a quelle biologiche, le quali si basano esclusivamente sul modo con cui questi esseri si riproducono e si diffondono.

Alcuni hanno uno sviluppo diretto, sono cioè *monogeni*, ed hanno bisogno per compiere la loro evoluzione di un solo ospite, nel quale giungono sotto forma:

1° *di uova* per lo più embrionate (*Oxyurus*, *Trichocephalus*, *Ascaris*);

2° *di embrioni* (*Strongylus*);

3° *di larve* (*Ankylostomum*, *Uncinaria*);

4° *di embrioni nati da una generazione sessuata* che conduce vita libera (*Strongyloides*).

Di contro a questi nei quali l'evoluzione è più o meno semplice vi sono altri parassiti in cui il ciclo evolutivo è complicato: hanno bisogno, per raggiungere lo sviluppo completo, di passare necessariamente da un ospite ad un altro e quello in cui si svolge il periodo di vita larvale (*ospite intermedio*) è diverso da quello (*ospite definitivo*) in cui lo stesso parassita raggiunge il periodo adulto. Questi parassiti chiamansi *eterogeni*: e per *trasmigrazione* s'intende il passaggio da un ospite all'altro. Solo in via eccezionale lo stesso individuo può albergare la forma larvale di un parassita del quale è abitualmente ospite definitivo (es. l'uomo che alberga la *Taenia solium* può essere invaso da Cisticerchi) e lo stesso parassita può in una o in più fasi di sviluppo indifferentemente invadere ospiti diversi (Echinococco, Trichina). Di regola però può dirsi che ciascun ospite ha i propri parassiti, che si trovano solo in lui e sempre nella stessa fase di sviluppo. Quindi perchè possa essere garentita la loro

esistenza sono necessari i due ospiti: la sottrazione di uno di questi, interrompendo il ciclo di vita, può portare alla scomparsa del parassita.

Ed è su questo principio che si basa sopratutto la profilassi delle malattie prodotte da questi parassiti eterogeni: distruggere uno degli ospiti o sottrarlo alle possibili invasioni parassitarie.

Anche questi parassiti si comportano in modo diverso:

1° La femmina emette degli embrioni; una parte di questi emigra nei tessuti dell'ospite senza subire modificazioni notevoli, un'altra invece, giunta nell'ambiente esterno, invade un animale di specie diversa, emigra e s'incista ne' suoi muscoli: vi raggiunge uno sviluppo più avanzato e attende che il primo ospite si cibi del secondo per infestarlo e continuare nel ciclo che deve mantenerne la specie (es.: *Ollulanus tricuspis*: allo stato adulto parassita del gatto, allo stato cistico dei topi).

2° Gli embrioni emessi dalla femmina invadono i tessuti dello stesso ospite che albergava la genitrice, ma perchè essi possano giungere alla maturità sessuale è necessario che vengano ingeriti da altri individui (*Trichina*).

3° Le uova, contengano o no embrioni, vengono espulse dal corpo di un ospite definitivo. Le stesse uova o gli embrioni, che da esse sono fuoriusciti, passano in un nuovo ospite (l'intermedio). Qui si trasformano in esseri asessuati diversi da quelli che li hanno generati e non raggiungeranno la forma sessualmente matura se non dopo una o più trasmigrazioni (*Taenia solium*, *T. saginata*, *T. coenurus*, *Bothriocephalus latus*, *Distoma*, ecc.).

Propagazione de' parassiti. — Diversissimo è il modo con cui i parassiti possono propagarsi.

a) *Propagazione attiva.* Infatti noi vediamo che alcuni parassiti e più specialmente quelli *intermittenti*, usufruendo de' mezzi di locomozione che sono loro concessi, vanno *attivamente* da un ospite all'altro (*Zanzare*, *Cimici*, *Sanguisughe*, *Tafani*, ecc.). Parimenti in modo attivo si fa la propagazione per quei parassiti periodici de' quali gli adulti conducono vita libera (*Estridi*, *Dermatobie*, ecc.). In questi però la diffusione è affidata alle cure della madre. Così ad esempio noi vediamo che la femmina del *Gastrophilus equi* depone sui peli delle zampe anteriori del cavallo le sue uova, le quali, lambite da esso, aderiscono alle papille della lingua per poi giungere allo stomaco.

b) *Propagazione per contatto*: *diretto* quando un individuo sano si infesta avvicinando uno malato (*Sarcoptes*, *Phthirius*, *Pediculus capitis*); *indiretto* quando l'infestazione avviene per il tramite di indumenti, lenzuola od oggetti contaminati (*Pediculus vestimenti*, *Sarcoptes*, ecc.).

c) *Propagazione passiva.* Per gli altri parassiti il modo di propagarsi varia a seconda che abitino in organi o tessuti che già comunicano con l'esterno o dai quali si può eventualmente stabilire una comunicazione coll'esterno, oppure si trovino in organi, tessuti o cavità perfettamente chiuse.

Nei primi il passaggio in un ospite sano è affidato al puro caso e l'infestazione avviene per il tramite delle acque, degli erbaggi, ecc., che possono contenere uova od embrioni espulsi con le feci (*Ascaris, Oxyuris, Trichocephalus*), con gli escreati (*Strongylus, Linguatula*) o messi in libertà per comunicazione stabilitasi col mondo esterno (*Filaria medinensis*); nei secondi per lo più avviene sia perchè l'individuo sano mangia o in parte o nella totalità l'ospite intermedio del parassita (*Teniae, Bothriocephalus*, ecc.), sia perchè per la trasmissione interviene un altro animale (*agente trasmettitore*) come vediamo nelle Zanzare, che possono trasmettere i parassiti malarici e gli embrioni della Filaria i quali vivono nel sangue, e nelle Glossine che trasmettono la Tripanosomiasi, ecc.

Difesa dei parassiti contro le cause di distruzione. — Le cause di distruzione e di perdita cui vanno soggetti le uova, gli embrioni e le larve dei parassiti sono straordinarie e dipendono in parte dalle condizioni dell'ambiente, in parte dalle difficoltà cui vanno incontro per trovare a loro portata ed a tempo adatto sia l'ospite intermedio sia quello definitivo. A queste cause distruttrici i parassiti contrappongono da un lato dei mezzi di difesa speciali, dall'altro la straordinaria fecondità. Fra i primi vanno annoverati: lo spessore del guscio delle uova (*Ascaris, Trichocephalus*); la possibilità che gli embrioni chiusi entro il guscio dell'uovo hanno di resistere agli agenti esteriori mediante una vita latente che nell'Ascaride, ad esempio, può durare anche quattro anni; la facoltà che alcuni embrioni sottoposti all'essiccamento hanno di ritornare in vita quando l'ambiente torna umido (Railliet ha visto riprendere l'attività ad un embrione di *Strongylus filaria* dopo dieci mesi di essiccamento); la proprietà di chiudersi dentro capsule protettive che si formano a spese del parassita stesso (larve di Anchilostomi che si incapsulano, Cercarie che si incistano); la resistenza al calore e al freddo (le larve di Trichina resistono fino a -20° e $+70^{\circ}$), alla putrefazione, al digiuno (Railliet tenne un *Argas reflexus* 14 mesi entro un vaso di vetro, Laboulbène un *Argas persicus* cinque anni vivo senza nutrimento).

Per quanto riguarda la fecondità sono noti i calcoli del Gerlach, il quale ritiene che da una sola femmina di *Sarcoptes scabiei* fecondata, si possono avere dopo tre mesi 1,000,000 di femmine e 500,000 maschi; è anche ben noto che in un anno le proglottidi espulse di una *Taenia saginata* contengano 150 milioni di uova; che la *Filaria medinensis* giunta a maturità si trasformi in un sacco ripieno di embrioni; che un solo uovo di Distoma è capace di dare 320 altri Distomi adulti, giacchè da ogni uovo nasce un embrione ciliato, da questo nascono due sporocisti che sono capaci di produrre 8 Redie ciascuna, ed ognuna di queste produce circa 20 Cercarie che dànno altrettanti Distomi adulti; quindi se si considera il numero straordinario di uova che è capace di emettere ogni Distoma durante il suo non breve periodo di vita, si vedrà facilmente quanto eccessiva sarà la riproduzione di questi Trematodi.

Che cosa poi dovrebbe dirsi della fecondità veramente sbalorditoria della *Taenia coenurus* e della *T. echinococcus*?

Questa resistenza non comune e la fecondità così eccezionale farebbero supporre che i parassiti dovessero trovarsi con molta frequenza e sempre assai numerosi nell'organismo dell'uomo e degli animali. Effettivamente però non è così giacchè nell'uomo, quando si riscontrano, sono per lo più scarsi, e qualche volta il parassita è unico.

Non mancano però casi in cui si riscontrano nello stesso individuo moltissimi esemplari della stessa specie di Elminti (*omopolielmintiasi*) o casi in cui nello stesso organismo si riscontrano parassiti numerosi appartenenti a generi e specie diversissimi fra loro (*polielmintiasi*). Bei casi di omopolielmintiasi furono descritti dal Parona, che rinvenne in un delfino 25,000 Echinorinci; dal Valentini che da un cavallo raccolse tanti *Ascaris megalocephala* da sorpassare tre chilogrammi di peso; da me che in un solo piccione rinvenni 1470 *Heterakis maculosa*, dal Roux che in una contadina trovò 90 Botriocefali, ecc.

La presenza simultanea di più specie di parassiti nello stesso individuo è abbastanza comune ed è molto facile rinvenire nell'uomo Ascaridi, Ossiuridi, Tricocefali ed Anchilostomi associati.

Origine delle malattie parassitarie. — La presenza del parassita nell'organismo umano costituisce la causa principale delle malattie parassitarie, ma ad essa assai spesso se ne uniscono molte altre secondarie che hanno grande importanza per la genesi del morbo stesso. Queste possono distinguersi in:

1° Cause igieniche. Ciò che non è conforme all'igiene contribuisce allo sviluppo e propagazione dei parassiti; e cioè:

a) *Condizioni igieniche delle abitazioni e degli abitanti.* Le Cimici, Pulci, Pidocchi, Acari, ecc., si riscontrano più frequentemente nelle case o sulle persone poco pulite.

b) *Abitudini sociali od individuali.* Le agglomerazioni di persone, l'avere i capelli lunghi, il cibarsi di erbe crude, di carni poco cotte, l'avere sempre vicino i cani, ecc., favoriscono la propagazione della ossiurosi, della scabbia, della pediculosi, della lombricosi, teniasi ed echinococcosi.

2° Cause climatiche:

a) *Temperatura.* Nei climi caldi le malattie parassitarie sono più numerose, più frequenti, più gravi. Nell'estate sono più comuni le Pulci, le Mosche, le Zanzare, gli Ixodidi, le Cimici, ecc. Nell'autunno i Trombididi e nell'inverno i Pediculini. Gli Ossiuridi sono più frequenti in gennaio, l'Ascaride in febbraio, il Tricocefalo in aprile.

b) *Umidità.* È indispensabile per lo sviluppo di moltissime larve come Zanzare, Anchilostomi; di embrioni, Ascaridi, Ossiuridi, ecc. e le malattie che da esse derivano non esistono ove manchi questa condizione indispensabile di ambiente.

3° Cause inerenti alle professioni e mestieri. I pastori sono più soggetti alla echinococcosi; i fornaciai, solfatari, minatori all'anchilostomiasi; i lavoratori delle sostanze zuccherine alla scabbia de' droghieri (*gale des épiciers, grocer's itch*) data dal *Glyciphagus*; quelli della vainiglia al *vainiglismo professionale* causato dal *Tyroglyphus*; i cenciaiuoli, i ciabattini sono più facilmente affetti da cisticercosi; i custodi dei buoi da *myiasis cutanea* prodotta dalle larve di *Oestrus*, ecc.

4° Cause inerenti all'individuo:

a) *Età*. L'*Oxyuris* è più frequente nei bambini; la *Bilharzia* nei giovani; mentre tanto l'uno come l'altra sono assai rare nei vecchi.

b) *Costituzione*. I deboli, malaticci e convalescenti sono più soggetti alle malattie parassitarie.

c) *Sesso*. La bilarziosi è più frequente negli uomini.

5° Cause dipendenti dalla sede e numero dei parassiti. Sarà tanto più grave la malattia quanto maggiore sarà il numero di essi, e quanto più delicato e importante l'organo invaso. Così un Cisticerco isolato nelle masse muscolari passa inosservato, è invece pericoloso per la vista se, anche solo, è localizzato nell'occhio, può divenire letale se si trova nel cervello. Un Ascaride, che si nutre del dipiù di sostanze nutritive del nostro intestino, è alle volte innocuo se risiede nel lume intestinale, diviene dannoso se penetra nel canale coledoco, o in quello di Virsung, mortale, se risalendo l'esofago e giungendo al laringe, cade nella trachea. Se poi il numero di essi cresce di molto e sopratutto se si trovano in un individuo giovane o debole riescono dannosi assai e per l'ostacolo che possono portare alle correnti intestinali e per la sottrazione di quel nutrimento che l'ospite non può cedere senza suo grave scapito, e per le sostanze tossiche che possono secernere.

Il più delle volte però questa influenza dannosa che i parassiti esercitano sull'ospite viene controbilanciata dalla resistenza individuale di questo, ma quando ciò non accade, quando in altri termini insorge una malattia parassitaria, questa può esplicarsi in modo diverso a seconda cioè dei vari modi con i quali il parassita stesso esercita la sua azione.

Meccanismi di azione de' parassiti. — Essi sono di natura diversa e possono agire o isolatamente oppure combinarsi fra di loro e divenire complessi. In ogni modo possono riunirsi nelle seguenti categorie:

1° Azione meccanica:

a) *Per occlusione*. Così agiscono le Tenie e gli Ascaridi quando, numerosi nel nostro intestino, ne ostruiscono il lume; gli Ascaridi quando, abbandonando la sede normale, chiudono il canale di Virsung; i Distomi che si incuneano nel coledoco ed impediscono il deflusso della bile; le Filarie quando, ostacolando il corso della linfa, divengono causa di edemi, linforragie, chiluria, elefantiasi.

b) *Per compressione.* Gli Echinococchi ed i Cisticerchi possono agire in tal guisa e determinare compressione del cervello o deviazione dell'occhio quando si localizzano nella cavità cranica od in quella orbitaria; ugualmente agisce l'*Eustrongylus* quando, giunto nel bacinetto renale, per il suo accrescimento produce una compressione della sostanza che viene ad atrofizzarsi completamente.

c) *Per traumatismo.* La massima parte dei parassiti cutanei riescono dannosi a noi per i traumatismi che producono, per le lesioni che con ciò arrecano all'ospite e per la possibilità che hanno di inoculare o altri parassiti o germi patogeni. Così si comportano i Pediculini, gli Acari, gli Ixodidi, tutti i Ditteri pungenti, le larve di questi che vivono sia sulla cute, sia nelle cavità naturali; parecchi Elminti intestinali che o per nutrirsi o per attaccarsi, o per le emigrazioni recano lesioni che ledono la continuità dei tessuti o, alterandone la struttura, ne impediscono la funzione.

2° Azione tossica. Se questo modo di agire è ancora sospettato per molti parassiti, per altri invece fu dimostrato direttamente o indirettamente. Così oggigiorno nessuno può più dubitare che gli Anchilostomi e i Botriocefali esplicano la loro azione patogena con la produzione di veleni speciali, e che la vescicola perlata nella scabbia e i fenomeni riflessi nelle elmintiasi intestinali sono conseguenza della inoculazione di secrezioni indubbiamente dannose per l'organismo dell'ospite.

3° Azione sottrattiva. A prescindere dalle sostanze tossiche che sono capaci di segregare o che si producono per la presenza dei parassiti stessi, vi sono dei casi in cui la genesi delle malattie parassitarie è dovuta esclusivamente al potere che essi hanno di sottrarre i materiali nutritivi che l'ospite ha elaborato per proprio uso e consumo. Così i parassiti malarici nutrendosi a spese del globulo rosso lo distruggono completamente; così gli Ascaridi, i Botriocefali, le Tenie possono rendersi dannosi, specialmente in individui giovani, solo per il fatto della sottrazione della sostanza nutritiva in mezzo alla quale vivono; così anche gli Anchilostomi possono unire alla loro azione eminentemente tossica l'azione sottrattiva che può avere una certa importanza quando si è in presenza di malati gravi o di persone indebolite o delicate.

Diagnosi delle malattie parassitarie. — La *diagnosi* delle malattie prodotte dai parassiti animali difficilmente può desumersi dalla sintomatologia soltanto. Il più delle volte non esiste un quadro fenomenologico proprio e caratteristico: può venirci in aiuto l'anamnesi, e la conoscenza dell'*habitat*, delle abitudini, delle professioni, del regime alimentare dell'ospite. Però, se vogliamo esser sicuri dell'origine parassitaria di una malattia, non dobbiamo limitarci a ciò ma ricorrere a tutti i mezzi di ricerca e di esame di cui oggi fa tesoro la clinica.

Nell'organismo umano i parassiti occupano le sedi più svariate e tutti i liquidi normali o patologici, tutti i tessuti, tutti gli escreati, tutti i mate-

riali di rifiuto possono contenerne, così dall'esame di tutto ciò possono trarsi conclusioni sicure e diagnosi precise.

L'esame delle feccie ad esempio ci dirà quali saranno i parassiti dell'intestino e delle glandole che a questo sono annesse o con esso han rapporti; l'esame del sangue, quello del catarro bronchiale o nasale, del cerume, del contenuto gastrico, del liquido spermatico, del muco vaginale, delle urine ci metteranno in evidenza i parassiti, le uova o gli embrioni che ivi si trovano. L'esame della pelle anche può servirci bene per distinguere se il parassita abitando nel suo spessore vi abbia determinate lesioni o se queste siano state conseguenza del suo passaggio, delle sue punture, dei suoi prodotti tossici.

In ogni modo però una malattia potrà dirsi di origine parassitaria solo quando si sarà rinvenuto il *corpo del delitto* rappresentato dal parassita stesso, oppure dagli elementi che della sua presenza dànno indiscutibilmente la prova (uova, embrioni, larve, uncini, membrane cistiche, ecc. ecc.).

Profilassi delle malattie parassitarie. — La *profilassi* delle malattie parassitarie, specialmente per quel che riguarda i mezzi diretti contro la causa principale di esse, contro cioè il parassita è troppo variabile, dipendendo ciò dalla varia natura, dalla diversità di evoluzione, di genere di vita e di modi di propagazione dei parassiti stessi. Salvo quindi a parlare in seguito delle misure speciali da adottarsi caso per caso, mi limiterò qui a dire come per impedire lo sviluppo di una malattia parassitaria non dovranno mai trascurarsi anche le altre misure d'indole generale dirette contro le cause predisponenti, sieno esse organiche, locali o sociali, le quali se hanno sempre una ragione di esistere, hanno maggior valore per alcune malattie dovute a quei parassiti contro i quali, essendo ignorato il ciclo evolutivo ed il modo di penetrazione nell'organismo umano, non possono prendersi misure profilattiche speciali.

PARTE II.

DESCRIZIONE ED EVOLUZIONE DEI PARASSITI.

Abbiamo già detto in principio che i parassiti animali dell'uomo noi dobbiamo ricercarli fra i Protozoi, i Vermi e gli Artropodi. Lasciando da parte i primi, che formano oggetto del capitolo della *Protozoologia*, in questa parte dobbiamo occuparci solo dei Vermi e degli Artropodi (1).

Tipo: VERMI.

Fra le numerose classi che oggi si fanno appartenere al tipo dei vermi tre sole interessano il parassitologo: I Platelminti, i Nematelminti e gli Anellidi. Mentre però fra le due prime troviamo il massimo

(1) Mi limiterò a parlare solo di quei fra i parassiti animali dell'uomo che sono più comuni e che interessano il medico-igienista.

numero de' parassiti dell'uomo, nell'ultima ne troviamo solo poche specie appartenenti agli Irudinei.

PLATELMINTI.

A questa classe appartengono i Vermi che hanno un corpo appiattito a forma di nastro o di foglia, per la massima parte ermafroditi, nei quali il parassitismo ha portato una grande modificazione e spesso atrofia in molti organi. Si dividono in più ordini, fra i quali ci interessano solo i Cestodi e i Trematodi, che si differenziano per i seguenti caratteri:

Corpo	segmentato-nastriforme, assenza di tubo digerente	CESTODI, tipo: *Taenia*
	non segmentato, tubo digerente incompleto, privo di ano, bocca anteriore situata al fondo di una ventosa. . . .	TREMATODI, tipo: *Distoma*

1° ord.: **Cestodi.**

Sono de' Platelminti nastriformi (κεστός nastro, εἶδος forma) il cui corpo è costituito da una testa (*scolice*) e da un numero variabile di



Fig. 264. — Scolici de' Cestodi più comuni.
A, *Taenia saginata;* B, *Taenia solium;* C, *Bothriocephalus latus.*

segmenti (*proglottidi*). Lo scolice, che si presenta come un rigonfiamento anteriore variabile per forma, è munito di organi di fissazione (ventose, botridi, uncini) (fig. 264): ad esso fa seguito un collo per lo più filiforme,

senza traccia di segmentazioni, il quale si continua in un corpo o strobila costituito dall'insieme delle *proglottidi*, *anelli*, *segmenti* di cui le dimensioni aumentano progressivamente quanto più si allontanano dal collo. Le proglottidi più giovani sono quelle che si trovano vicino alla testa, e per lo più sono più larghe che lunghe; le più vecchie sono le più lontane e sono in generale più lunghe che larghe (fig. 265).



Fig. 265. — Strobila di un Cestode (*Bothriocephalus latus*).

I Cestodi sono ermafroditi e gli organi genitali maschili e femminili, che sono i soli apparati anatomici bene sviluppati, appariscono prima o poi in ogni proglottide, ne occupano la massima parte e si dispongono in guisa che i maschili generalmente si trovano nella faccia dorsale ed i femminili in quella ventrale.

L'apparato maschile è costituito da un gran numero di *testicoli* disseminati nello spessore della proglottide dai quali partono altrettanti *canalicoli deferenti*, che convergono e si riuniscono in un deferente comune (*spermadotto*) il quale penetra in una borsa muscolosa allungata (*borsa del cirro*) e si continua entro un organo copulatore (*pene* o *cirro*) che versa il liquido seminale in un infossamento della papilla genitale (*poro genitale*) ove, con lo sbocco della vagina si origina l'apparato femminile. Il poro genitale può essere unico o doppio, marginale o mediano, unilaterale o alterno: la posi-

zione di esso nella proglottide costituisce un carattere diagnostico di grande importanza (fig. 266).

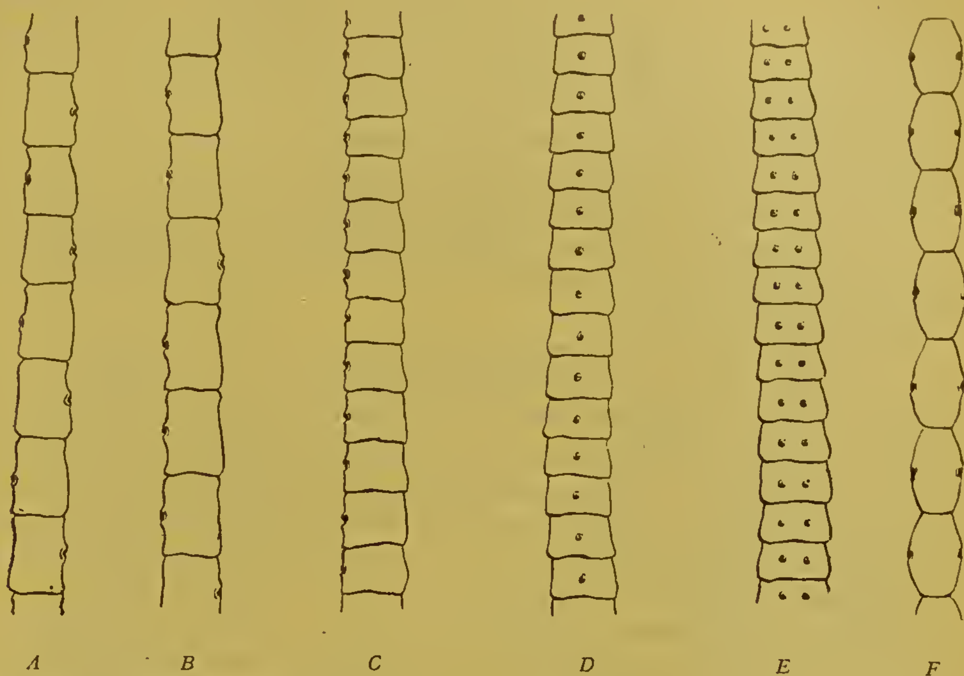


Fig. 266. — Disposizione dei pori mediani nei Cestodi. *A*, regolarmente alterni; *B*, irregolarmente alterni; *C*, unilaterali; *D*, mediani; *E*, doppi mediani; *F*, doppi marginali.

L'apparato genitale femminile è costituito dalle *ovaia* o *germigeni* generalmente in numero di due; da un *ovidutto*: da una *vagina* che può presentarci una porzione dilatata (*ricettacolo seminale*) e da un *utero*. Come glandole annesse esistono i *vitellogeni*, i cui vitellodutti sboccano nell'*ovidotto*, e le *glandole del guscio* (fig. 267).

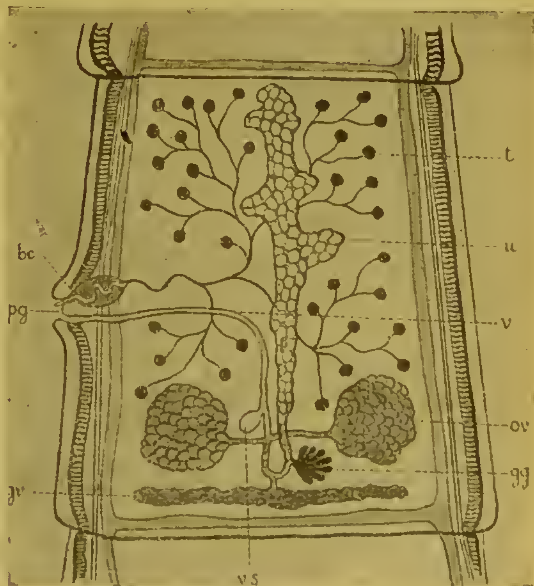


Fig. 267. — Schema dell'organizzazione interna di una *Taenia*. *t*, testicoli; *bc*, borsa del cirro; *pg*, poro genitale; *v*, vagina; *vs*, ricettacolo seminale; *gv*, glandola vitellogena; *gg*. glandola del guscio; *ov*, ovaia; *u*, utero.

Se noi prendiamo ad esempio una delle comuni Tenie dell'uomo, noi vediamo che la fecondazione avviene in questo modo: gli spermatozoi partono dalle vescichette testicolari e si fanno un cammino attraverso il tessuto fondamentale dell'anello e, per i deferenti, giungono al deferente comune: da qui vanno nel cirro e, per mezzo di questo, entrano da prima nel seno genitale e poi in vagina, da dove passano nel serbatoio spermatico o ricettacolo seminale.

Intanto dai germigeni si staccano una ad una le cellule germinali

mature: passano nell'ovidutto ove trovano subito lo sbocco del dotto seminale che si continua col ricettacolo. Qui, avvenuta la fecondazione, sboccano successivamente anche i prodotti delle *glandole vitellogene* e della *glandola del guscio*. Le uova fecondate, avvolte dall'ammasso del vitello e dal guscio, spinte dalla *vis a tergo* delle altre uova, che si staccano dalle ovaia, penetrano nell'utero.

Questo può presentarci forme diverse ed avere o un poro uterino che si apre all'esterno e per il quale vengono continuamente emesse le uova, oppure può occupare una porzione maggiore o minore della proglottide senza avere mai comunicazioni con l'esterno. Nel primo caso (Botriocefali), esso si presenta tubuloso e ravvolto su sè stesso (a rosetta) e la sua apertura è separata dal poro genitale.

Nel secondo caso può essere costituito da un canale semplice a fondo cieco che occupa la parte longitudinale mediana della proglottide e che per l'afflusso continuo e straordinario di uova subisce prima delle dilatazioni erniarie, le quali poi si trasformano in vere ramificazioni che dànno all'organo l'aspetto caratteristico (*Taenia solium, Taenia saginata*); oppure l'utero occupa tutta la proglottide ed in esso le uova o si ripartiscono uniformemente (*Hymenolepis*), ovvero si riuniscono in gruppi più o meno numerosi entro capsule speciali (*Dipylidium, Davainea*).

Se esiste una apertura speciale per l'emissione delle uova queste verranno a trovarsi libere nelle feccie e le proglottidi vuote si raggrinzano formando come una specie di coda del verme; se l'utero è a fondo cieco allora perchè le uova vengano messe in libertà è necessario che la proglottide intera si distacchi e venga a macerarsi.

Le uova dei Cestodi più comuni parassiti dell'uomo, quando sono mature, pur non avendo la medesima forma, nè la stessa struttura, contengono nell'interno un embrione armato di sei uncini mobili disposti a paia, il quale prende il nome di *oncosfera* od *embrione esacanto*. Nelle specie però in cui esiste un poro uterino l'uovo possiede un guscio robusto, munito di opercolo e, sebbene già nell'interno dell'utero subisca un principio di sviluppo, l'embrione si forma solo nell'ambiente esterno, e, quando abbandona l'uovo, è munito di ciglia con le quali per qualche tempo nuota liberamente nell'acqua (Botriocefali). Nelle specie invece in cui manca il poro uterino il guscio dell'uovo sia semplice o multiplo, spesso o sottile, contiene già un embrione ben sviluppato anche quando le proglottidi mature, unite allo strobilo si trovano nell'intestino dell'ospite. Questo embrione è chiuso in un involucro speciale (*embrionoforo*) molto spesso e resistente, che per lo più è composto da numerosi bastoncelli o prismetti chitinosi cementati da sostanza calcarea.

In molte Tenie il guscio dell'uovo, fragilissimo, si rompe con estrema facilità anche per semplice pressione fatta sulle proglottidi mature; allora è l'embrionoforo che, messo in libertà, prende impropriamente il nome di uovo.

Nei Cestodi, perchè lo sviluppo non si arresti è assolutamente necessario che l'oncosfera passi in un animale (terrestre od acquatico) adatto di specie determinata, diversa da quella che albergava la forma adulta, che subisca in altre parole una migrazione.

Penetrato in questo ospite adatto (*ospite intermedio*) l'embrione, per la distruzione del suo embrionoforo, diviene libero: per meccanismi svariati e in alcuni casi non ben precisati va a situarsi in quel punto dell'organismo

che più si confà al suo sviluppo e là si tramuta in una forma larvale che varia secondo le diverse specie dei Cestodi assumendo anche nomi diversi (Cisticerco, Cenuro, Echinococco, Plerocercoide, ecc.).

Perchè poi questa forma larvale possa trasformarsi in verme nastriforme è ancora necessario un altro passaggio attraverso un nuovo ospite (*ospite definitivo*); in altre parole occorre che un individuo appartenente alla stessa specie di quello che aveva espulso le uova ed albergava la forma adulta, ingerisca o tutto o parte di quell'ospite intermedio che nei suoi organi o nei suoi tessuti conteneva la forma larvale.

Quindi prendendo ad esempio la *Taenia solium*, riassumendo quanto si è detto fino ad ora, si avrà che lo svolgimento tipico dei Cestodi nelle sue diverse fasi è il seguente:



A questi svolgimenti tipici fa eccezione la *Hymenolepis nana* (Tenia nana) i cui embrioni, liberati dall'embrionoforo, una volta giunti nel tubo digerente di un ospite, si infossano nella mucosa dell'intestino: qui si trasformano in vermi cistici (cisticercoidi) e poi, cadendo nuovamente nel lume intestinale, vi divengono adulti. Questa Tenia ha quindi per ospite intermedio quello stesso individuo nel quale vive da adulta.

Come eccezione debbo anche far notare che in alcuni casi e per alcuni Cestodi l'ospite definitivo di una specie può divenire ospite intermedio della stessa specie. Così ad esempio l'uomo che abitualmente è ospite definitivo della *Taenia solium* può infestarsi con Cisticerchi: il cane che alberga abi-

tualmente la *Taenia echinococcus* può essere invaso dalla sua forma cistica: l'Echinococco.

Le forme larvali dei Cestodi sono diverse fra loro e possono, per quanto riguarda quei che vivono parassiti dell'uomo, o interessano il medico-igienista, raggrupparsi nelle seguenti forme tipiche:

1° *Cisticerco:* in cui l'oncosfera, trasformata in vescicola, dà luogo per gemmazione ad un solo scolice (forma monocistica, monosomatica). (*Taenia solium*, *Taenia saginata*).

2° *Cenuro:* In questa forma la vescicola derivata dall' oncosfera dà luogo per gemmazione a più scolici (forma policistica, polisomatica). (*Taenia coenurus*).

3° *Echinococco:* L'oncosfera si trasforma in una vescicola madre che genera una quantità di altre vescicole (proligere e figlie), le quali son capaci di produrre più scolici (forma policistica, polisomatica). (*Taenia echinococcus*).

4° *Cisticercoide:* L'oncosfera, trasformata in vescicola allungata, si divide ben presto in due porzioni: una vescicolare, che per gemmazione produrrà lo scolice, l'altra più o meno allungata (appendice caudale) nella quale si riscontrano gli uncini embrionali. (*Dipylidium*, *Hymenolepis*).

5° *Plerocercoide:* L'oncosfera si trasforma in una larva vermiforme sprovvista di vescicola caudale. (*Bothriocephalus*).

***

I Cestodi parassiti dell'uomo appartengono alle due famiglie seguenti che si differenziano per i seguenti caratteri:

Scolice	con quattro ventose ellittiche o circolari .	Fam. *Taeniadae*
	con due fessure o botridii	Fam. *Bothriocephalidae.*

Fam. **Taeniadae.**

Cestodi che presentano uno scolice con 4 ventose; in mezzo ad esse può esservi un rostrello più o meno retrattile, armato di uncini. L'utero manca di orificio esterno. Il cirro e la vagina sboccano in un poro genitale che è laterale (1). Uova con guscio sottile senza operculo. Oncosfere chiuse dentro uno o più involucri.

Le Tenie che finora furono riscontrate nella specie umana appartengono ai quattro generi: *Taenia*, *Dipylidium*, *Hymenolepis*, *Davainea*.

Gen. TAENIA (Lin., 1758).

Scolice con rostrello per lo più armato da una doppia corona di uncini caratteristici alcuni più grandi, altri più piccoli, che ci offrono tre parti essenziali: un manico, una guardia ed una lama (fig. 268).

Il rostrello può mancare ed al suo posto esiste allora una depressione a guisa di ventosa rudimentale.

(1) Il solo genere *Mesocestoides* di cui la specie *M. lineatus* è parassita del cane, volpe, lupo, ecc., presenta i pori genitali sulla linea mediana.

Collo più o meno lungo. Proglottidi varie per forma: le giovani più larghe che lunghe; le medie quadrate; le mature sempre più lunghe che larghe. Pori genitali laterali, sporgono sul margine delle proglottidi e sono più o meno regolarmente alterni.

I testicoli numerosissimi si trovano sparsi in tutta la proglottide ad eccezione dei margini laterali.

Le ovaia e le glandole accessorie si trovano nella metà posteriore di essa. L'utero, che nelle proglottidi giovani è costituito da un tubo rettilineo situato sulla linea mediana, nelle adulte, per il riempirsi che fa di uova, manda ramificazioni laterali. Queste man mano vanno ad invadere lo spazio occupato prima dagli altri organi genitali che si atrofizzano.



Fig. 268. — Uncini di *Taenia solium.*

Uova a guscio sottile, fragilissimo. Embrionoforo spesso, grosso, costituito da prismi cementati fra loro in guisa che al microscopio sembra striato radialmente.

La forma cistica appartiene al tipo del Cisticerco, del Cenuro e dello Echinococco.

Taenia solium (Lin., 1767), Tenia armata.

È uno dei vermi solitari che abitano l'intestino tenue dell' uomo: difficilmente supera allo stato completo la lunghezza di tre metri. La testa è globosa e tetragona, della larghezza di circa 1 mm., al cui apice si presenta un rostrello che può invaginarsi, e che è munito di 26-30 uncini, gli uni più piccoli di mm. 0.110-0.140; gli altri più grandi di mm. 0.160-0.180, disposti in due file, ma di cui gli apici arrivano tutti allo stesso livello; ai lati dello scolice si notano quattro ventose rotondeggianti.

Il collo è lungo e molto sottile: i primi anelli sono molto corti e vanno man mano aumentando in lunghezza quanto più si discostano dalla testa. Si può calcolare che, ad un metro circa da questa, le proglottidi si presentano quadrate; mentre quando sono mature sono lunghe da 10 a 12 mm. su



Fig. 269. — Proglottidi mature di *Taenia solium* (dal vero).

una larghezza di 5-6 mm. Queste, specialmente se sono rischiarate con acido acetico, compresse fra due vetri e osservate per trasparenza, fanno vedere l'utero formato da un tronco mediano, con ramificazioni laterali spesse, non molto numerose (7-13) e disposte dendriticamente (fig. 269).

Lo strobila intero si compone per lo più di 800 a 900 anelli: difficilmente oltrepassa questo numero, perchè, quando questi hanno raggiunto la maturità, *si distaccano per gruppi di* 5, 10, 12; solo rarissimamente uno ad uno; gruppi che *vengono espulsi sempre insieme con le feci;* non lasciano mai spontaneamente l'intestino ed *hanno movimenti propri appena percettibili.*

I pori genitali sono quasi sempre regolarmente alterni.

Le uova hanno il guscio sottilissimo ed estremamente fragile; solo eccezionalmente possono riscontrarsi nelle feccie, ove pure assai di rado si rinvengono gli embrionofori. Questi sono giallastri, striati radialmente *quasi sempre sferici* con un diametro di 31-36 μ e contengono un embrione esacanto, anche esso sferico, del diametro di 20 μ.

La diagnosi quindi di presenza della Tenia nell'intestino, non potendo basarsi sui sintomi troppo svariati ed incerti, nè potendo fondarsi sulla ricerca delle uova, deve farsi esclusivamente sul reperto delle proglottidi, sulla loro struttura e sul modo di espulsione.

Gli embrionofori poi per il tramite delle erbe, od anche per mezzo delle feccie stesse, di cui spesso si cibano i maiali, giungono nello stomaco di questi ove, digeriti dal succo gastrico, l'oncosfera è messa in libertà. Allora questa, con l'aiuto dei sei uncini di cui è munita, si insinua fra gli elementi anatomici della mucosa stomacale od intestinale e arriva fino ai capillari; donde poscia, trasportata dalla corrente sanguigna, giunge nei tessuti o negli organi. Qui gli uncini cadono e l'embrione subisce una trasformazione idropica. Man mano si viene e formare una parete propria; poi, per introflessione della vescicola e per gemmazione di essa, si forma in breve lo scolice delle forme larvali, che poi è simile in tutto e per tutto a quello della forma adulta. Contemporaneamente l'organismo dell'ospite non resta indifferente e il tessuto che circonda il parassita prolifera formandogli all'intorno una capsula connettivale dovuta alla reazione infiammatoria circostante.

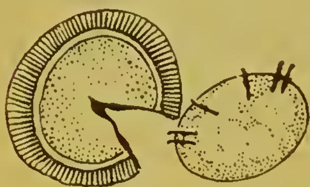


Fig. 270. — Embrione di Tenia uscito dall'embrionoforo (dal vero)

Dall'embrione si origina in tal modo il Cisticerco (*Cysticercus cellulosae*, Rud.) il quale, quando ha raggiunto il suo massimo sviluppo, quattro o cinque mesi circa dopo avvenuta l'ingestione della forma embrionale, si rinviene negli organi o nei tessuti, chiuso entro una capsula connettivale la quale però manca se il Cisticerco viene a trovarsi nelle meningi, nei ventricoli cerebrali e nelle camere anteriore o posteriore dell'occhio.

Tolto dalla capsula o cisti esso ha forma di una vescicola ellittica o rotonda, a seconda dell'organo in cui si trova; la sua grandezza è variabilissima giacchè ciò dipende dalla sua età: però quando ha raggiunto il massimo di sua crescenza il diametro maggiore è di 8, 12, 16 mm. ed il minore di 5, 10 mm.

È trasparente e nell'interno ci presenta una massettina bianco-opaca, *receptaculum capitis*, che racchiude lo scolice ed il collo invaginato. Sicchè in ogni Cisticerco dobbiamo considerare tre parti principali: la *vescicola*, la *testa*, il *collo* (fig. 271).

La vescicola, che costituisce come un sacco o serbatoio nutritivo, è formata da una parete sottile, trasparente, e da un liquido interno che comprende su cento parti 9.65 d'acqua; 2.90 di albumina e 0.60 di sali, sopratutto di

idroclorato di sodio e sembra ricco di leucomaine. In un punto della superficie della vescicola, specialmente se si guarda contro luce, si osserva una lieve depressione nel cui centro si trova una piccolissima apertura, *ilo*, dal quale, sia in seguito a dolce o a graduale pressione, sia immergendo il Cisticerco in una soluzione fisiologica tepida (35°-38°), si svagina dapprima il collo e in ultimo la *testa*. Questa non differisce in nulla dalla testa di una Tenia



Fig. 271. — Prime fasi di sviluppo della *Taenia solium*: *a*, uovo; *b*, embrionoforo contenente l'embrione; *c*, embrione libero; *d*, Cisticerco invaginato; *e*, Cisticerco svaginato (schematico).

adulta; il *collo* invece è costituito di due porzioni una più vicina alla testa (collo propriamente detto) molto ristretto, trasparente, con pieghe trasversali molto sottili; una più lontana (detta anche *corpo*), più larga, bianco-lattea, opaca, per i numerosi corpuscoli calcarei che contiene, e fortemente striata.

Il Cisticerco può vivere a lungo nei tessuti del maiale e sebbene si conoscano parecchi casi in cui esso muore prima di giungere al massimo del suo sviluppo, ve ne sono altri dai quali si deduce che la sua vita può durare tre, sei e anche più anni (1).

La morte avviene per lo più per degenerazione calcarea, ma può anche avvenire per caseificazione. Nel primo caso nulla più resta del parassita, la cui sede è rappresentata da un nodulo ellittico di sali calcarei e nel secondo caso, invece, in mezzo ad una massa caseosa si possono riscontrare gli uncini.

La resistenza vitale dei Cisticerchi è variabile. Se sono isolati dalle carni muoiono presto, non resistendo affatto all'essiccamento: tenuti nell'acqua a temperatura di +47° +48° muoiono in brevissimo tempo. Nella carne macellata e tenuta a temperatura naturale possono vivere fino a 29 giorni e più. Nelle carni cotte perchè muoia occorre, secondo Perroncito, che ogni punto della carne raggiunga i 48°-50° e vi rimanga per 10 minuti: secondo Hertwig, a 65°, secondo Richard, a 70°. Ora, siccome il criterio migliore, dato da Ostertag, sulla cottura delle carni è la loro decolorazione (ciò che avviene fra i 60° e i 70°), si può esser sicuri che una carne non sanguinante, che abbia perduto il colorito naturale in ogni punto del suo interno, se anche contenga Cisticerchi, questi sono sicuramente morti, quindi innocui.

(1) Nell'uomo si sono avuti casi di cisticercosi che datavano da molti anni. Così Achard cita un caso di Cisticerco sottocutaneo durato 23 anni. Roth e Iwanoff osservarono un caso di cisticercosi cerebrale i cui primi sintomi rimontavano a 23 anni, Braun e Hirschberg parlano di due individui che presentavano Cisticerchi nell'occhio da 20 anni, ecc.

La *salagione* uccide i Cisticerchi quando le carni ridotte in piccoli pezzi vi si sottopongono per un periodo non minore di tre settimane.

L'*affumicatura* delle carni può essere utilizzata quando, essendo prolungata, con essa agisce l'essiccamento. Se usata in modo rapido, solo per dare odori speciali alle carni, non ha alcuna influenza.

Il *raffreddamento* agisce anche bene. Le esperienze del Boccalari dimostrano che la morte del Cisticerco avviene in 4 giorni, se le carni sono congelate a — 4° — 6° e in 6 giorni se refrigerate da 0° a — 2°; mentre vivono 10 giorni se sono conservate in luogo fresco (0° a + 2°).

Se le carni di maiale non hanno subìto uno qualunque dei trattamenti suddetti o li hanno subìti incompletamente, il Cisticerco perviene vivo ed intatto nello stomaco dell'uomo, la vescicola vien digerita dal succo gastrico e lo scolice, passato nell'intestino, con l'aiuto delle ventose e degli uncini si fissa alla mucosa.

Comincia tosto la gemmazione, e si sussegue incessante la formazione delle proglottidi. Dopo circa 12 settimane il verme ha raggiunto la sua lunghezza normale e gli anelli principiano ad essere espulsi con le feci in pezzi di catena; ricomincia in altre parole il ciclo evolutivo del parassita.

L'uomo quindi si infesta di *Taenia solium* esclusivamente mangiando della carne suina che contiene Cisticerchi vivi, *carne panicata*, carne di maiali affetti da *grandine*, *panicatura*, *cisticercosi*.

La carne affetta da questa malattia si presenta sotto aspetti diversi secondo il grado di panicatura e secondo la sede del Cisticerco (vedi *Ispezione delle carni*).

A rigore di termini si può dire che il Cisticerco non abbia una sede di predilezione ben definita giacchè, se si riscontra quasi costantemente nel tessuto muscolare, non si può asserire che si trovi più in uno speciale muscolo che in un altro, potendo essere invasi indifferentemente tutti i muscoli.

Nè sono rari i casi ne' quali, mentre si rinvengono scarsissimi i Cisticerchi nel tessuto muscolare, se ne trovino abbondantissimi nel cervello, sotto le meningi, fra le circonvoluzioni cerebrali. Nei casi di panicatura grave, quando cioè i Cisticerchi sono in numero eccessivamente grande, ad ogni taglio muscolare le vescicole caudali vengono incise, e le masse bianche opache che costituiscono gli scolici ed il collo sporgono sulla superficie del taglio stesso come grossi grani di miglio lucenti e bagnati dal liquido vescicolare. Se la panicatura invece è lieve, il taglio può non colpire ma rasentare le vescicole; allora queste si presentano nella loro integrità, con l'asse maggiore disposto nel senso della lunghezza delle fibre muscolari che, per la presenza del parassita, si vedono spostate.

In ogni modo le carni suine che si presentano affette da cisticercosi sia essa grave o leggera non debbono mai essere ammesse al libero consumo, ma sottoposte a quei trattamenti che l'esperienza ha suggerito, che i regolamenti impongono e che servono a distruggere i Cisticerchi e quindi ad impedire la propagazione della Tenia nell'uomo.

Le misure profilattiche adottate nei vari mattatoi per impedire la propagazione della *T. solium* nell'uomo dànno infatti de' buoni risultati giacchè se la panicatura nei maiali è assai frequente e uniformemente distribuita in tutta Italia (nel mattatoio di Roma si ha una percentuale nei suini macellati dell'1.45 %) non così frequente è la presenza della *T. solium* nell'in-

testino dell'uomo. Una statistica del Parona, fatta dal 1868 al 1899, porta che, su circa 468 casi di verme solitario dell'uomo, solo 71 erano dovuti a *T. solium*. Su 132 casi osservati in Milano, solo undici appartenevano alla Tenia armata. Dalle mie osservazioni ho potuto constatare che in Roma è di una rarità eccezionale e può calcolarsi che appena l'1 % dei casi appartenga alla *T. solium*. Quantunque rara, essa però non sempre si trova solitaria nell'intestino: spesso esistono più esemplari nel medesimo individuo, ed io stesso ho potuto far espellere ad un ammalato 5 esemplari di *T. solium*, che misuravano in media 2 metri ciascuno, le cui ultime proglottidi avevano anelli perfettamente maturi.

L'uomo, che normalmente alberga la forma adulta della *Taenia solium* può eccezionalmente infestarsi con embrionofori di Tenia armata ed essere invaso da Cisticerchi. Ciò può avvenire sia per ingestione di oncosfere insieme agli alimenti (verdure, frutti, insalata), sia ingoiando della polvere o terra che contenga uova, sia anche, ciò che avviene nè coprofagi, ingerendo una proglottide matura.

Può darsi anche il caso che avvenga una autoinfestione, la quale consiste nel regurgito di uno o più segmenti maturi del verme dal duodeno nello stomaco.

Qui giunte le oncosfere vengono messe in libertà e, come nel maiale, emigrano negli organi o nei tessuti seguendo una via diversa secondo i vari autori.

Infatti, mentre alcuni credono che la migrazione avvenga direttamente attraverso i tessuti, altri credono che gli embrioni seguano la via sanguigna ed altri infine la linfatica. In ogni modo, qualunque sia la strada, giungono al luogo di elezione che nell'uomo è molto variabile, come variabilissimo è il numero dei parassiti essendo questo conseguenza del puro caso. Qualche volta il Cisticerco è unico o almeno tale apparisce, altre volte invece se ne contano 20, 100 e persino parecchie migliaia, quando la cisticercosi è generalizzata. Il parassita unico per lo più risiede nell'occhio (orbita, palpebre, congiuntiva, camera anteriore, vitreo, cristallino, retina, ecc.). Quando sono più possono trovarsi sia nell'occhio, sia nelle varie regioni dell'encefalo (sostanza cerebrale, ventricoli laterali, meningi). Qui, se risiede nella base del cervello, fra le circonvoluzioni e la parete ossea assume una forma irregolare divenendo ramificato, deformato, strozzato in vari punti, tanto che fu ritenuto come una forma a sè e descritto con nomi diversi (*C. racemosus*, Zenker. *C. multilocularis*, Kuch). Se la cisticercosi è grave e generalizzata, allora i parassiti si localizzano di preferenza nel cervello, poi nel tessuto connettivo intermuscolare e sottocutaneo del petto, della spalla, della coscia: quindi, in ordine di frequenza, nel cuore, nei polmoni, nell'apparato digerente, nel tessuto glandolare (1), apparato genito-urinario e tessuto osseo. Se l'*età* non ha una grande influenza per lo sviluppo del Cisticerco, giacchè fu riscontrato tanto in bambini di sei mesi (Heller) quanto in vecchi di 83 anni (più frequente però è fra i 20 e 40 anni), sembra che abbia influenza per la sede, giacchè fino a dieci anni fu riscontrato nella lingua, mani, apparato respiratorio e tessuto osseo, fino ai 20 anni si riscontra con gran fre-

(1) Nella glandola mammaria fu riscontrato un Cisticerco dal prof. Alessandri in un'ammalata del Policlinico, la quale presentava un tumore il cui aspetto e decorso clinico simulava quello di un tumore maligno. (Boll. Acc. Medica).

quenza nell'occhio, dopo i 40 anni si ripartisce ugualmente fra le varie regioni dell'organismo, e dopo i 60 quasi esclusivamente nell'encefalo. Oltre l'età hanno una certa importanza: il *sesso*, giacchè nell'uomo è più frequente che nella donna; e le *condizioni sociali*. I mendicanti, dementi, idioti, coprofagi ne vanno indiscutibilmente più soggetti; come anche è assai comune fra i rivenditori di stracci, i rammendatori di abiti vecchi, i ciabattini, i calzolai, i guardiani di porci e i contadini, i quali tutti possono portare alla bocca polvere o terra con uova di Tenia.

È anche molto frequente in coloro che uccidono i maiali e nei norcini, in una parola in coloro che hanno contatto con quegli animali o ne manipolano la carne cruda. I primi, infatti, facilmente si infestano portando alla bocca le mani imbrattate, sopratutto col toccare o lavare la pelle di porci piena di fango e quindi di uova; i secondi andando con grande frequenza soggetti alla Tenia, possono ammalarsi per autoinfestione. Il *regime alimentare* ha sullo sviluppo della cisticercosi umana una grande influenza: l'abitudine infatti di mangiare erbaggi crudi, frutta con la buccia, acqua non pura, porta senza dubbio una maggiore frequenza di essa.

È logico che, data la presenza di Cisticerchi nell'uomo, essi apporteranno delle lesioni irritative, meccaniche o traumatiche e dei sintomi che saranno esclusivamente in rapporto con la sede e col numero di essi. Così noi vediamo che le cisticercosi del cervello e dell'occhio sono per loro stesse sempre gravi, anche quando esiste in questi organi un solo Cisticerco: mentre che il più delle volte nel tessuto muscolare passano inosservate, a meno che non si tratti di un caso generalizzato e grave.

La diagnosi di cisticercosi nella maggior parte dei casi è impossibile a farsi: solo sarà facile quando il Cisticerco risieda in un luogo accessibile ai mezzi di comune esplorazione (occhi, pelle).

Lo studio del sangue, in ogni modo, può metterci nella buona via, giacchè esiste quasi sempre una eosinofilia più o meno spiccata (7-12 %) quantunque alcuni autori abbiano riscontrato una formula leucocitaria perfettamente normale.

Come misura profilattica contro la cisticercosi umana occorre evitare la diffusione della *T. solium*, e impedire l'ingresso delle uova nello stomaco dell'uomo. Quindi: 1° lavaggi accurati prolungati e ripetuti degli erbaggi, frutta che soglionsi mangiar crudi; 2° pulizia accuratissima delle mani specialmente negli individui che sono affetti da *T. solium*; 3° evitare l'autoinfestione di questi con somministrazioni di antielmintici adatti.

Taenia saginata (Goeze, 1782); *T. inermis* (Brera, 1802); *T. mediocanellata* (Küchenmeister, 1855); Tenia inerme.

Anche essa è parassita dell'intestino tenue dell'uomo: la sua lunghezza oscilla fra i quattro e gli otto metri.

Lo scolice è piriforme, largo 1-2 mm. con una depressione all'apice, senza rostro nè uncini. Le ventose in numero di quattro, sono ellittiche e spesso, come la depressione apicale, sono pigmentate in nero. Il collo è lungo, metà più stretto della testa. Lo strobila si compone di 1200 a 2000 proglottidi, di cui le prime sono molto più larghe che lunghe in un gran tratto della catena, quelle mature sono più lunghe che larghe, e misurano 16-20 mm. per 5-8 mm.

I pori genitali si riscontrano irregolarmente alterni. Nelle proglottidi mature, l'utero è formato da un tronco mediano con numerose ramificazioni laterali (30-35), sottili, molto ravvicinate l'una all'altra, e disposte dicotomicamente (fig. 272).

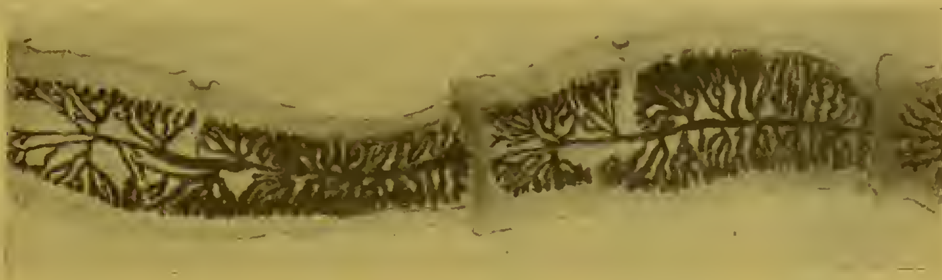


Fig. 272. — Proglottidi mature di *Taenia saginata* (dal vero).

Le uova sono generalmente elissoidi, il guscio è abbastanza resistente e alle volte, se si esaminano a fresco, dopo la rottura della proglottide, esso ci presenta uno o più filamenti.

Gli embrionofori sono striati radialmente, trasparenti, per la massima parte *elissoidi*, e misurano 30 × 36 μ. Non di rado però si osservano embrionofori perfettamente rotondi di 32-36 μ di diametro (fig. 273).

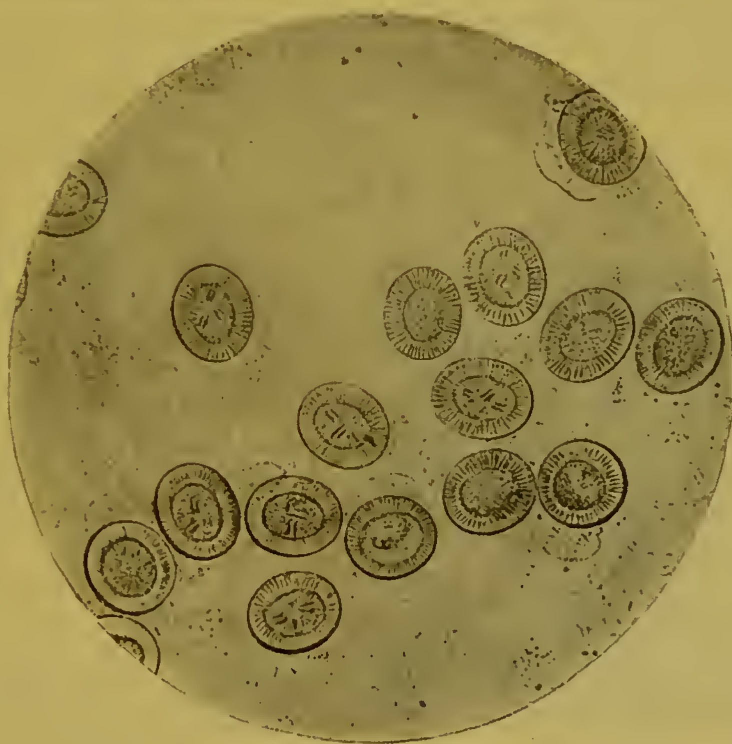


Fig. 273. — Uova di *Taenia saginata* (dal vero)

L'embrione esacanto misura, liberato dell'embrionoforo, circa 20 μ di diametro.

Gli anelli maturi si *staccano isolatamente* dal resto dello strobila, *sono dotati* di *movimenti proprî* contrattili ed *escono spontaneamente* dall'apertura

anale negli intervalli fra una defecazione e l'altra. Non è raro il caso che i malati li ritrovino nel letto o in mezzo alle loro biancherie.

Gli embrionofori disseminati sul suolo e messi in libertà per la distruzione del tessuto dell'anello, giungono insieme alle erbe nello stomaco di alcuni ruminanti (buoi). Qui sono distrutti dai succhi gastrici e lasciano uscire l'embrione, che emigra nei tessuti dell'ospite ove ha bisogno, per giungere al massimo dello sviluppo larvale, di 4-6 mesi circa. Trascorso questo periodo, si presenta anche esso sotto forma di un Cisticerco (*Cysticercus bovis*, Cobb), che cresce e si comporta nei tessuti dei buoi come il *C cellulosae* si comporta in quelli del maiale. Raggiunge un massimo di mm. 7 in lunghezza per mm. 5 di lunghezza: lo scolice svaginato è inerme e simile a quello della forma adulta che da lui deriva. La sua durata di vita è breve, appena pochi mesi, giacchè subisce facilmente una degerazione calcarea.

La sua resistenza al calore, all'affumicatura, alla salagione è pressochè uguale a quella del *C. cellulosae*.

Se l'uomo mangia della carne bovina che contenga Cisticerchi inermi viventi non tarderà ad albergare nel suo intestino la *T. saginata*. Questa si rinviene con relativa frequenza ed io stesso ho potuto constatare che il 99 % dei casi di verme solitario son dovuti qui in Roma alla Tenia inerme. Questo fatto è in contrasto con quanto si constata ne' mattatoi, ove invece è piuttosto raro il rinvenimento del *C. cellulosae*. Perchè ciò?

Io credo che questa mancanza di rapporto si debba alle seguenti cause:

1° I buoi, essendo esclusivamente erbivori, ingoiano solo quei poch embrionofori che si possono trovare sparsi sulle erbe o sospesi nelle acque che bevono.

Perciò la panicatura in essi è quasi sempre leggera, e solo come eccezione si trova una cisticercosi diffusa.

2° La panicatura leggera rende difficile il reperto del parassita, che per di più è anche abbastanza piccolo.

3° La sede di predilezione dei Cisticerchi è in vicinanza degli ammassi grassosi intermuscolari donde la maggiore difficoltà, per non dire impossibilità, di scorgerli.

4° I muscoli che di preferenza sono invasi (cuore, masseteri, pterigoidei, laringei, faringei, della lingua, pilastro del diaframma), solo in pochi macelli formano oggetto di investigazione.

5° La carne di manzo si usa con maggior frequenza ed è troppo invalsa l'abitudine di mangiarla poco cotta.

Anomalie delle Tenie. — Le due Tenie di cui finora ci siamo occupati possono presentarci delle anomalie che, modificando il loro aspetto potrebbero condurre in errore (fig. 274). Le più note ebbero i seguenti nomi:

1° *Tenia fenestrata*: rappresentata da tenie i cui anelli per un assottigliamento e perdita di sostanza nel centro, possono presentarsi perforati.

2° *Tenia nera* o *pigmentata*: quando il pigmento oscuro, che per lo più è localizzato attorno alle ventose, si estende a tutta la testa e anche al verme tutto intero.

3° *Tenia continua*: quando avviene la fusione di più anelli di guisa che in mezzo ad anelli normali possono trovarsene alcuni assai lunghi con

più pori genitali situati tutti nello stesso margine, oppure alternativamente alcuni da una parte ed altri nel margine opposto.

4° *Tenia triedra, triquetra, prismatica*: quando avviene la fusione più o meno completa di due individui, che si saldano per uno dei loro bordi, di

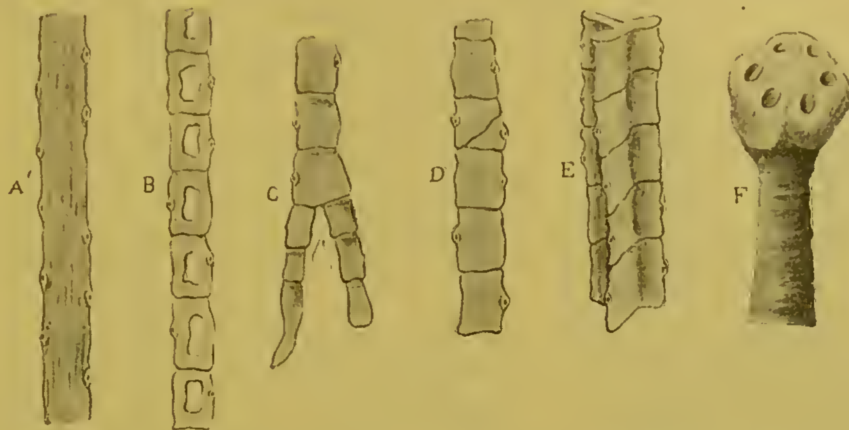


Fig. 274. — Anomalie più comuni di *Taenia saginata*. A, *Taenia fusa*; B, *Taenia fenestrata*; C, Tenia con strobila biforcato; D, Anello intercalare; E, Tenia triedra; F *Taenia lophosoma*.

guisa che la sezione che da essi deriva è a forma di Y o di X. In questo caso non è raro riscontrare anche lo scolice con sei ventose. (*T. lophosoma*, Cobbold).

5° *Tenia con anelli intercalari*: quando si trovano lungo lo strobila anelli incompleti incuneati fra due anelli interi e normali.

6° *Tenia inerme con uncini.*

7° *Tenia armata priva di uncini.* (Una delle cinque Tenie che furono espulse da uno stesso individuo (vedi pag. 985) era priva di uncini e presentava invece del rostrello, una depressione come nella *T. saginata*).

8° *Tenia a corpo estremamente assottigliato e ridotto* (*T. tenella*, Cobbold).

Inoltre non è raro il caso di rinvenire nella stessa proglottide l'unione di due o più uteri e di constatare ai margini dell'anello stesso più pori genitali (fig. 275).



Fig. 275. — Proglottide anomala di *Taenia saginata* (originale).

Gen. DIPYLIDIUM (R. Leuck, 1863).

Lo scolice ha un rostrello retrattile con più serie di corone di uncini a forma di spine di rosa e base discoidale. Ogni proglottide ha l'apparato genitale doppio, quindi due pori genitali che sono marginali ed opposti.

I testicoli numerosissimi si riscontrano nella parte mediana del segmento. Ovaia bilobate, glandole vitelline piccole, dietro di esse. Utero a forma di

rete, nelle cui maglie si contengono i testicoli. Man mano che questi si atrofizzano, il reticolo uterino si riempie di uova, e da queste disteso si trasforma in tante saccoccie, ciascuna delle quali si separa dall'altra e viene a costituire una capsula ovigera, contenente un numero variabile di uova a doppia membrana trasparente. La larva è un cisticercoide (*Cryptocystis*).

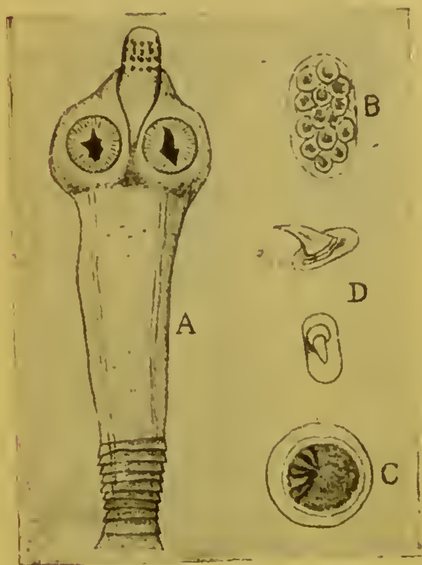


Fig. 276. — *Dipylidium caninum*. A, scolice e collo; B, capsula ovigera; C, uovo; D, uncini.

Dipylidium caninum (L., 1758); *Taenia canina* (Lin., p. p., 1758); *T. cucumerina* (Bloch, 1782); *T. elliptica* (Batsch, 1786) (fig. 276).

Il verme intero misura da 15 a 35 cm. di lunghezza con una larghezza massima nelle proglottidi mature di mm. 3. Lo scolice è piccolo e porta un rostro retrattile armato da 3 a 4 corone di uncinetti variabili di numero e grandezza, gli anteriori sono più grandi e più robusti dei posteriori. Ventose proporzionatamente molto grandi, ellittiche. Collo sottile cortissimo; le proglottidi anteriori sono corte e larghe, le mediane tanto lunghe quanto larghe ma con i margini a convessità esterna, le ultime sono più lunghe che larghe (5.8 mm. × 3 mm.) ad estremità anteriore e posteriore ristretta e margini laterali convessi. Quindi lo strobila ha un aspetto moniliforme e le proglottidi isolate somigliano a semi di melone. Esse, quando sono mature, lasciano spontaneamente l'intestino: si presentano per lo più colorite in rosa e fanno vedere benissimo ad occhio nudo i pori genitali simmetrici ai margini laterali. Al microscopio si vedono benissimo nell'interno di esse le capsule che contengono 8 a 15 uova. Queste sono rotonde del diametro di 43-50 μ con embrionoforo molto sottile e trasparente, di guisa che l'oncosfera è ben visibile nel suo interno e misura da 28 a 35 μ.

Il *Dipylidium caninum* è parassita assai comune del cane e dei gatti: ma nei primi raggiunge dimensioni un po' maggiori. Fu trovato nell'uomo 60 volte e più frequentemente nei bambini al disotto degli otto anni. Due casi furono descritti in ragazzi di 13 e 15 anni, sei casi in adulti dai 20 ai 55 anni.

Per lo più non si rinviene solitario; in un caso si rinvennero da 40 a 50 esemplari nello stesso ammalato.



Fig 77. — *Cryptocystis trichodectis* non perfettamente maturo (dal Braun).

Il Cisticercode di questa Tenia (*Cryptocystis trichodectis*, Villot) (fig. 277) fu rinvenuto per la prima volta dal Melnikow (1869) nella cavità generale del corpo del Pidocchio de' cani (*Trichodectes latus*, Nitsch), ma si riscontra più frequentemente (Grassi e Rovelli) nelle Pulci canine (*Pulex serraticeps*, P. Gervais) e Pulci dell'uomo (*P. irritans*, L.). Si presenta sotto forma di una vescicola nel cui interno si vedono bene il rostrello invaginato con le sue file di piccoli uncini e le ventose; ad essa fa seguito poi uno strozzamento e in ultimo una specie di coda stretta e lunga che presenta le tre paia di uncini embrionali.

I cani, dando la caccia alle pulci o ai pidocchi e ingoiandoli ingeriscono anche i *Cryptocystis* e si infestano. I gatti invece possono eventualmente deglutirne lisciando il pelame con la lingua. È necessario però che tali forme larvali penetrino con le pulci intere nell'intestino tenue, giacchè i Cisticercoidi isolati muoiono a contatto de' succhi gastrici.

Nell'uomo l'infestazione avviene in conseguenza d'un caso fortuito sopratutto negli individui i quali vivono a contatto de' cani o gatti malati di Tenia ed invasi da Pulci. Queste infatti, saltando qua e là, possono per combinazione cadere sugli alimenti (minestre, latte, ecc.) ed infestarli.

La profilassi è abbastanza facile. Sbarazzare l'intestino de' cani e gatti dai vermi adulti, allontanarne i loro parassiti cutanei sia con bagni, sia con polveri insetticide e tener più lontano possibile *gli amici dell'uomo* dalle nostre abitazioni.

Gen. HYMENOLEPIS (Weinland, 1858).

Corpo piccolo sottile. Testa piccola con rostro retrattile armato od inerme. Proglottidi sempre più larghe che lunghe. Pori genitali unilaterali nel margine sinistro (1). L'utero maturo occupa tutta la proglottide. Uova rotondeggianti con tre gusci ben distinti l'uno dall'altro.

H. nana (v. Sieb, 1852) (fig. 278).

È di lunghezza variabile fra i 10 ed i 40 mm., con una larghezza massima di 0.5-0.95 mm. Testa quasi sferica con un rostro retrattile armato di un'unica serie di uncini in numero di 20-30. Collo lungo, metà più stretto della testa. Proglottidi mature larghe mm. 0.40-0.92; lunghe 0.14-0.30. I pori genitali sono situati tutti sul margine sinistro. Le uova ovalari o sferiche misurano 30-50 μ, hanno tre membrane, l'interna delle quali ci presenta ai poli un mammellone appena visibile. Contengono un embrione esacanto di 16-19 μ.

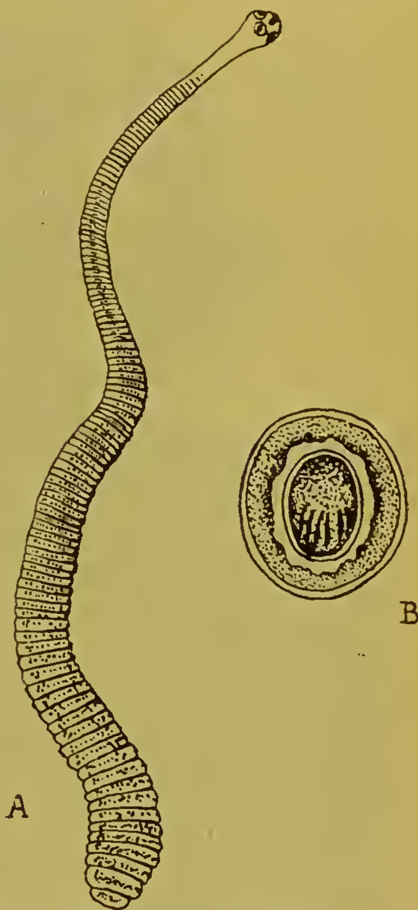


Fig. 278. — *Taenia nana*. A, strobila intero; B, uovo (dal Leuckart).

Questa specie scoperta nel 1851 in Egitto dal Bilharz è comune in Italia e specialmente in Sicilia. Vive nell'intestino tenue profondamente fissata sulla mucosa e si riscontra sopratutto nei bambini, alle volte in numero veramente straordinario (4000-5000). Se in piccola quantità in genere passa inosservata, ma se esistono in abbondanza possono determinare fenomeni piuttosto gravi e sopratutto coliche, diarrea alternata a stitichezza, disturbi di nutrizione, che conducono a forte dimagramento e persino ad uno stato cachettico; non mancano anche i disturbi nervosi di origine riflessa che son propri agli altri grandi Cestodi.

(1) La posizione destra o sinistra dei pori genitali deve considerarsi in rapporto a quella dell'apparato genitale femminile il quale occupa nella proglottide la faccia ventrale.

La infestazione avviene probabilmente per il tramite degli alimenti che contengono proglottidi od uova, come fu dimostrato per l'*H. murina*. Quando queste vengono ingoiate, i gusci sono digeriti, l'embrione è messo in libertà e s'insinua nella mucosa dell'intestino, alla base dei villi ove si trasforma in una larva a forma di bottiglia (*Cercocystis*) che, raggiunto il massimo di sviluppo, cade nel lume intestinale e diviene adulta.

La diagnosi si fa dall'esame delle feci, ove si possono trovare Tenie intere, frammenti di esse ed anche uova (fig. 279), le quali sono messe in libertà nell'intestino per rottura e digestione delle proglottidi mature.

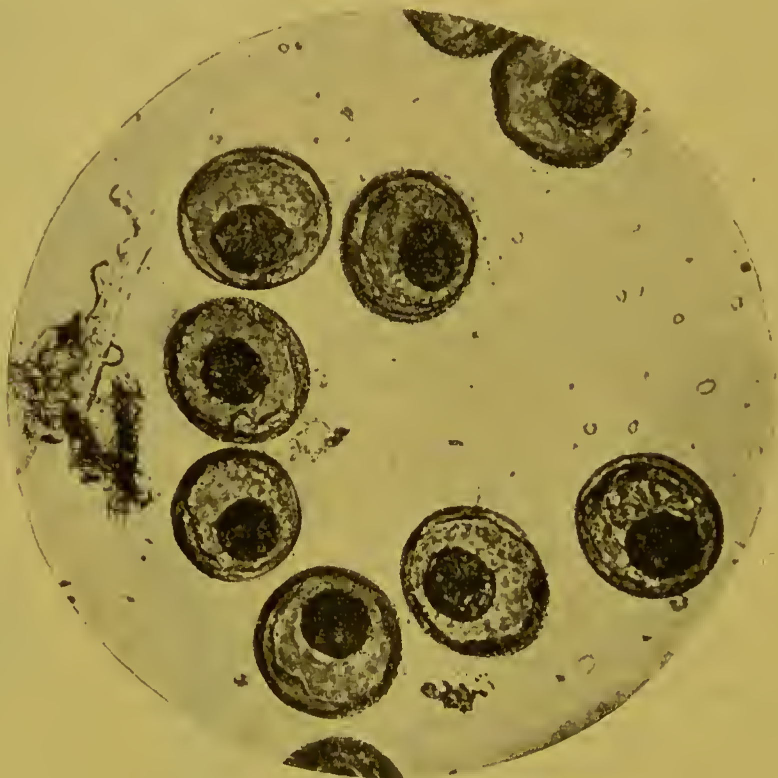


Fig. 279. — Uova di *Taenia nana* (dal vero).

Secondo il Grassi questa specie sarebbe identica alla *H. murina* (Duj) che vive nell'intestino dei topi, o tutto al più una varietà di essa. Moniez, Blanchard, Linstow credono invece che siano due specie affini, ma diverse, tanto più che non fu possibile infestare mai topi con proglottidi dell'*H. nana*, mentre che è dimostrato come essi si infestino di *H. murina* mangiando anelli maturi od uova embrionate di questa specie.

H. diminuta (Rud., 1819). [*Taenia flavopunctata* (Weinland)].

Questa specie vive abitualmente nall'intestino di molti topi, ma fu trovata più volte nell'uomo, ed in Italia fu descritta dal Parona, Grassi, Sonsino, Previtera.

È lunga 20-60 cm., con una larghezza massima di mm. 3-5.

La testa piccolissima, arrotondata in avanti è munita di quattro ventose e nell'apice presenta un rostello invaginato piccolo, inerme, rudimentale. Il collo è corto. Le proglottidi mature, sempre più larghe che lunghe, hanno i pori genitali tutti sul margine sinistro.

Le uova, rotonde od ovali, misurano 60 80 μ, presentano tre membrane: l'estrema lievemente striata radialmente e la interna con due mammelloni polari. Contengono un embrione ovale che misura μ 30 × 28. Esso normalmente si trasforma in forma larvale (*Cercocystis*) nella cavità del corpo tanto della Tignuola delle farine (*Asopia farinalis*) quanto in quella del suo bruco, ma può anche rinvenirsi in una Forficula (*Anisolabis annulipes*) ed in due Coleotteri (*Akis spinosa* e *Scaurus striatus*). Il *Cercocystis* ingerito dai sorci si trasforma nel tenue in Tenia adulta. L'uomo si infesterebbe ingerendo le forme larvali, che si possono trovare nelle farine o nelle frutta od alimenti invasi dagli insetti.

Allo stato adulto si rinvennero inoltre parassite dell'uomo le seguenti specie di Tenie delle quali mi limito solo a dare il nome, data la loro rarità e lo scarso interesse che per noi possono avere:

Taenia confusa (Ward, 1896), riscontrata due volte negli Stati Uniti.

Taenia africana (v Linstow, 1900), riscontrata in doppio esemplare in un soldato di razza nera, nei dintorni del lago di Nyassa.

Hymenolepis (*Drepanidotaenia*) *lanceolata* (Bloch) ospite abituale dell'intestino delle oche, anitre, marangoni, rinvenuta due volte in un bambino di 12 anni in Breslavia dallo Zschokke.

Davainea madagascariensis (Davaine) trovata nell'intestino umano e soprattutto nei bambini a Mayotte, Nossi-Bé (Comore), nell'isola Maurizio, a Bangkok (Siam) ed a George-Town (Gujana Inglese).

Forme larvali di Tenie parassite o dannose. — Alcune forme larvali di *Taenia*, oltre al *Cysticercus cellulosae*, si riscontrano parassite nell'uomo stesso, oppure, vivendo in altri animali domestici, ne alterano le carni o gli organi, di cui l'uomo si nutre.

Cysticercus tenuicollis (Küch, 1853) (fig. 280).

È la forma larvale di una grossa specie di Tenia (*T. marginata* Batsch, 1786), la quale vive nell'intestino dal cane. Questo Cisticerco si riscontra molto frequentemente nel peritoneo, ed anche, sebbene più raramente, nel pericardio e nella pleura di molti animali; ma generalmente nei ruminanti e nei maiali. Il volume della sua vescicola caudale, che dalla grossezza di un uovo di piccione può giungere a quella dell'uovo di una gallina, gli fecero dare il nome di « bolla d'acqua » dai macellai, come il nome di *tenuicollis* gli venne dato per la sottigliezza del collo. Generalmente nei maiali e nelle pecore, dove si riscontra con maggiore frequenza, se ne trovano in scarsissimo numero, ma se per caso uno di questi nostri animali domestici abbia



Fig. 280. — *Cysticercus tenuicollis* svaginato (dal vero).

ingerito in una sol volta un frammento di anello maturo di *T. marginata* (ciò che si è veduto anche per infestazione sperimentale), avvengono disturbi gravissimi al fegato, e l'animale può soccombere per emorragia epatica, dovuta alla emigrazione dei giovani Cisticerchi verso il peritoneo.

All'autopsia si riscontrano allora sia nel peritoneo (fig. 281), sia nel pericardio, sia anche nella pleura, una gran quantità di queste vescicole sferiche

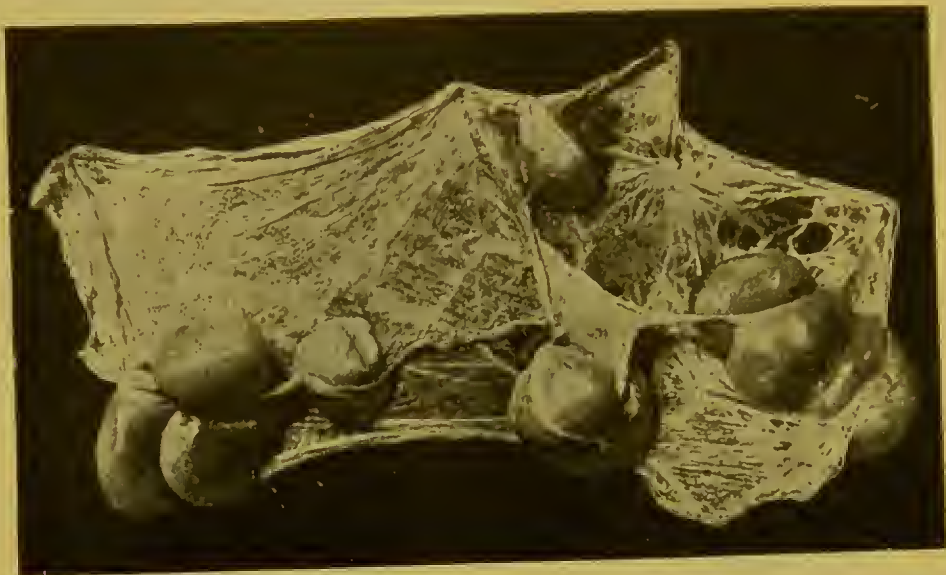


Fig. 281. — *Cysticercus tenuicollis* in peritoneo di bue (dal vero).

di varia grandezza, dalla cui superficie sporge una specie di picciuolo opaco, della grandezza di un grano di canapa, dal quale con leggera pressione si può estroflettere un lungo collo, all'apice del quale è una testa globosa con una doppia corona di uncini, in numero di 30-40. I più grandi hanno come caratteristica una lunghezza assai grande del manico in confronto della guardia: i più piccoli si mostrano con la lama molto arcuata.

La vescicola sempre molto grande in proporzione della testa e del collo, che è molto sottile, è trasparente, lievemente striata trasversalmente, è ripiena di un liquido chiaro e limpidissimo.

Gli organi invasi da questi Cisticerchi debbono essere distrutti.

Cysticercus pisiformis (Zeder).

È la forma larvale della *Taenia serrata* (Goeze) che è assai comune nell'intestino tenue dei cani. Questo Cisticerco ha la grandezza di un pisello. È chiuso generalmente entro una capsula connettivale formatasi a spese dell'ospite. Spesso però si trova libero nella cavità addominale, e qualche volta anche nel piccolo bacino. Quando è tolto dalla capsula connettivale si presenta sotto forma di una vescicola assai spesso ovale, alle volte allungata e piriforme. Se con leggera pressione si fa estroflettere il collo e lo scolice ed il Cisticerco, si vede nella sua estensione, si nota che la vescicola caudale ha come una specie di appendice posteriore e che il suo asse maggiore è sempre il longitudinale. Il collo è corto, la testa piriforme, munita di un rostrello con doppia corona di uncini in numero di 34-48 (per lo più 40), molto simili a quelli del *C. tenuicollis*, ma di cui i maggiori hanno un manico ancora più

lungo e diritto. Vive nel peritoneo delle lepri ed è anche comunissimo nei conigli. Si rinvengono per lo più in gran numero e non è raro il caso di riscontrare tutto il peritoneo invaso in modo da offrirci l'aspetto di veri grappoli (fig. 282). Siccome i Cisticerchi prima di giungere al luogo di elezione, che è sempre una sierosa, attraversano il fegato, se l'ingestione fu grave, avvengono tali alterazioni in questo organo, che l'animale ne muore.

Gli organi invasi debbono essere sequestrati e distrutti.

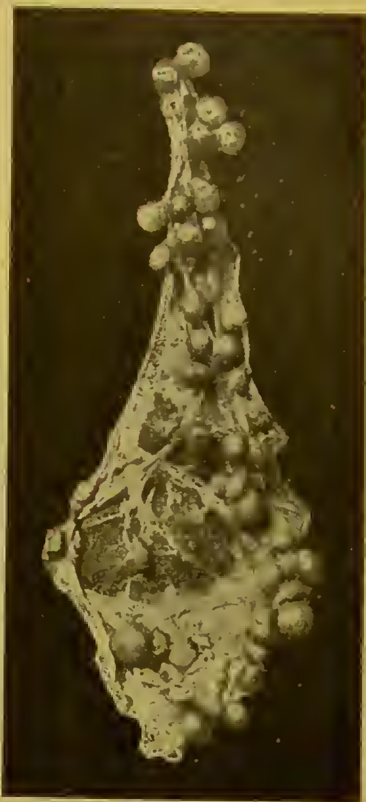


Fig. 282. — Peritoneo di coniglio con *Cysticercus pisiformis* (dal vero).

Coenurus cerebralis (Rud).

La forma adulta (*Taenia coenurus*, Kuch), vive nell'intestino dei cani; specialmente in quelli da pastori, dei lupi e delle volpi, mentre la forma larvale, monocistica e polisomatica, il *Coenurus cerebralis*, Rud, si trova nell'encefalo, e più raramente nel midollo spinale delle pecore; però fu ritrovato anche in altri animali erbivori, quali il bue, la capra, il capriuolo ed il cavallo. Essa è causa di quella malattia che va col nome di *capostorno* o *vertigine idatidea*. Gli erbivori si infestano di Cenuri mangiando con le erbe o bevendo colle acque uova di Tenia. I cani alla loro volta si infestano di Tenia quando mangiano i cervelli delle pecore ammalate.

La cisti varia di grandezza; da un pisello ad un uovo di tacchino.

La membrana che la limita è sottile, di un colorito bianco latteo, tra-

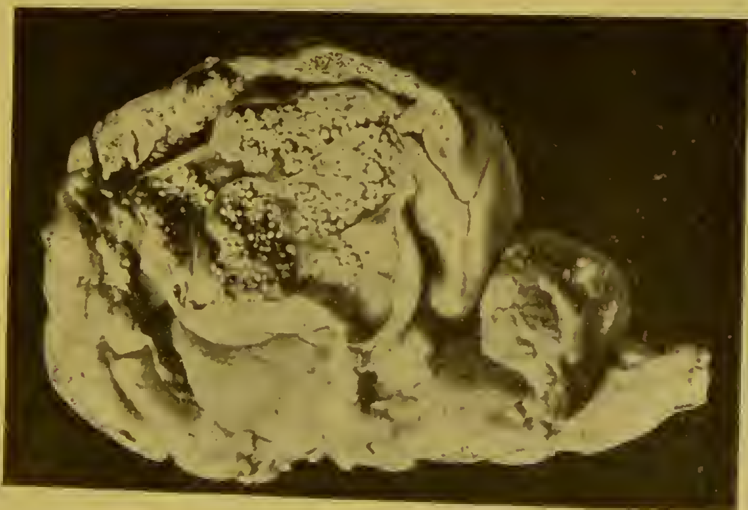


Fig. 283. — *Coenurus cerebralis* in cervello di pecora (dal vero).

sparente, alquanto contrattile e contiene un liquido limpido, incoloro, fluido. Per trasparenza si vedono all'interno riunite in gruppi più o meno nume-

rosi tante macchioline bianche, che rappresentano altrettanti scolici invaginati (fig. 283). Questi, quando siano entroflessi ed abbiano raggiunto il massimo di sviluppo, possono arrivare ad una lunghezza di 4-5 mm. Appariscono allora ben distinti gli scolici seguìti da un restringimento o collo molto ristretto e poi da un corpo che è ricchissimo di concrezioni calcaree. Secondo le ricerche del Davaine essi possono svaginarsi spontaneamente, ed allora determinano irritazione nella sostanza cerebrale e sono essi stessi causa di fenomeni che si vollero far dipendere esclusivamente dalla sola compressione della vescicola.



Fig. 284. — Cervello di pecora con lesione da *Coenurus cerebralis*.

Gli scolici sono piriformi, armati di un rostro piccolo, con una doppia corona di uncini in numero di 22-30 circa, di cui i più grandi, lunghi da 150 a 170 μ, hanno un manico, ondulato ai bordi, lungo quasi quanto la lama; i più piccoli vanno da 90 a 130 μ e hanno il manico ristretto all'indietro.

Nei cervelli possono trovarsi una o più piccole vescicole da Cenuro e spesso si nota che lo sviluppo di esse provoca la compressione e l'atrofia della massa cerebrale cui si sostituiscono (fig. 284). Quando questo parassita si localizza nel midollo spinale, seguendo lo speco vertebrale, acquista una forma allungata.

Per evitare che le pecore si ammalino di capostorno, si consiglia di sbarazzare i cani dalle tenie che albergano nel loro intestino ed impedire che poi si cibino delle teste di pecore, morte di tale malattia, tanto i cani quanto i lupi e le volpi. Le teste malate debbono essere distrutte col fuoco e non sotterrate, giacchè i lupi e le volpi specialmente attratti dall'odore, possono dissotterrarle, e, data la resistenza vitale dei Cenuri, infetarsi di Tenia e mantenere il ciclo evolutivo.

Le carni però degli animali ammalati possono essere utilizzate purchè essi si trovano in buone o discrete condizioni di nutrizione.

Echinococcus polymorphus (Diesing). È una forma parassitaria che merita di essere studiata attentamente sia per le lesioni che può arrecare all'uomo, sia per le alterazioni che porta nelle carni degli animali domestici delle quali l'uomo stesso si nutre.

Essa rappresenta la forma larvale della *Taenia echinococcus*, v. Sieb, Questa ha una massima lunghezza di 5-6 mm. Vive in gran numero nell'intestino dei cani, specialmente in quelli da caccia, da pastori ed in quelli che frequentano i macelli. Fu riscontrata pure nel lupo e nelle volpi. La testa di circa $^1/_3$ di millimetro porta un rostrello sul quale sono inseriti in doppia fila da 28 a 50 uncini di due grandezze: gli uni più grandi che misurano da 22 a 30 μ, gli altri più piccoli raggiungono i 18-22 μ. Collo sottile, corto.

L'intero strobila si compone normalmente di quattro segmenti (scolice compreso) di cui il penultimo ha gli organi sessuali distinti e ben sviluppati e l'ultimo solamente, il più grande, di circa 2 mm. di lunghezza, è maturo. Il canale mediano dell'utero riempiendosi di uova si dilata irregolarmente ed invece di darci ramificazioni ci offre delle tasche irregolari ove le uova si radunano a cumuli (fig. 285). Il numero di queste raramente sorpassa le 500. L'embrionoforo è radialmente striato, quasi sferico, con un diametro di 30-36 μ. L'embrione esacanto, penetrato con le acque o con gli alimenti nello stomaco di un ospite adatto e messo poi in libertà per la digestione del suo guscio, emigrando raggiunge diversi organi dando luogo alla forma vescicolare caratteristica che abbiamo chiamato *Echinococco polimorfo:* che rappresenta il tipo delle forme larvali policistiche e polisomatiche, e che è frequente nei bovini, suini, ed anche nell'uomo.


Fig. 285. — *Taenia echinococcus.*

La via che l'embrione percorre per giungere al punto di elezione è diversa secondo gli autori: o la emigrazione diretta attraverso i tessuti o la linfatica oppure la sanguigna. Questa sembra la più probabile; infatti le oncosfere attraversando la mucosa gastrica o intestinale, giungerebbero nel sistema della vena porta e penetrerebbero nel fegato. Qui, riscontrando capillari molto sottili, troverebbero un primo ostacolo e si fermerebbero. Quei pochi embrioni che possono però sormontare questo ostacolo, giungerebbero nel cuore destro donde per l'arteria polmonare arriverebbero ai capillari polmonari nei quali troverebbero un secondo ostacolo. Se questo pure fosse sormontato allora, tornando al cuore, sarebbero spinti nella grande circolazione e di qui ai vari organi.

Nè manca chi ritiene che segua altre vie; così Neisser ammette che l'embrione, penetrando in un chilifero, giunga nella vena cava per l'intermediario del canale toracico. Chacherau crede che, giunti all'ampolla rettale, vadano nelle vene del plesso emorroidario e poi alla cava; Devé suppone che dal duodeno penetrino nel plesso di Retzius e da qui vengano spinte o verso al fegato o verso il cuore destro.

L'Echinococco è una forma parassitaria che invade un gran numero di animali ed un gran numero di organi, però come fra quelli sono più specialmente invasi per ordine di frequenza le pecore, i buoi, il maiale e l'uomo, così fra i vari organi esso predilige dapprima il fegato, poi i polmoni e i reni, e quindi via via gli altri.

Quando l'embrione esacanto della *Taenia echinococcus* ha raggiunto la sede adatta, subisce delle modificazioni prima di giungere alla forma larvale, che prende il nome di *Idatide* od *Echinococco.*

In primo luogo, come abbiamo veduto per le altre forme cistiche, subisce una trasformazione idropica. Cresce molto lentamente giacchè, dopo la quarta o quinta settimana dall'avvenuta infestazione, raggiunge appena $^1/_4$-$^1/_3$ di mil-

limetro e dopo otto settimane arriva a mm. 1.5-5; e in questo periodo comincia a formarsi la cavità centrale della vescicola; intanto continua a crescere ed a 5 mesi misura 15-20 mm. Giunto a questo periodo di sviluppo assume la sua struttura caratteristica, comprende cioè: una *parete esterna*, stratificata, spessa (*strato* o *membrana cuticolare*), uno *strato interno* o *germinale* ed il *liquido cistico*.

La *parete esterna* è spessa, raggiunge un millimetro di spessore.

Essa è biancastra o bianco-giallastra e rassomiglia ad albume d'uovo coagulato. È formata da un gran numero di lamelle concentriche che possono isolarsi come i veli di una cipolla e che, quando si tagliano, si accartocciano immediatamente su loro stesse. È costituita per la massima parte di chitina e, trattata con acido solforico, dà glucosio. Allo stato vivente e quando è intatta non lascia passare nessun elemento figurato, pur prestandosi ottimamente ai fenomeni osmotici.

Lo *strato interno parenchimatoso* o *germinale* (strato proligero, parenchimale, germinativo, endocisti), è molto sottile, trasparente e si presenta granuloso.

Alla sezione microscopica si vede costituito di due strati di cellule, le une piccolissime e poco distinte, le altre grandi fra le quali esistono anche corpuscoli calcarei. Inoltre ad esso aderiscono numerosi corpicciuoli opachi, bianco-giallastri che altro non sono se non una proliferazione dello stesso strato e precisamente vescicole proligere e scolici.

Il *liquido cistico*, contenuto dalla vescicola, appena esaminato è chiaro, limpido come acqua. È neutro o debolmente alcalino, di densità fra 1005 e 1013. Non è coagulabile al calore. Allo stato normale non contiene albumina, di cui però si possono riscontrare traccie quando l'idatide è in istato anormale o patologico. È ricchissimo di cloruro di sodio (0.60-0.90 %), la sua presenza è un buon segno diagnostico e per rilevarla basta l'aggiunta di qualche goccia d'una soluzione di nitrato d'argento perchè, per la formazione di cloruro d'argento, si veggano deporre sul fondo abbondanti coaguli bianchi. Si possono inoltre trovare traccie di urea (Echinococco del rene), cristalli di ematoidina, succinati di calce e sodio, tirosina, leucina, inosite, colesterina, una sostanza simile alla caseina, un po' di zucchero ed una sostanza tossica cui vengono attribuite e le orticarie e le peritoniti osservate nell'uomo quando l'idatide viene a rompersi nella cavità peritoneale.

La vescicola da Echinococco così costituita (membrane e liquido cistico) può avere un accrescimento lento e progressivo e raggiungere anche la grossezza di una testa di feto, senza che nel suo interno avvengano modificazioni nuove nella struttura; si dice allora che la vescicola è sterile: e questa forma è quella che va col nome di *Acefalocisti*, *Echinococco cistico sterile*, *Idatide acefalocisti*.

Quando invece nell'interno di essa, per gemmazione della membrana proligera, viene a formarsi un gran numero di vescicolette sparse qua e là senza ordine e spesso raggruppate fra loro, allora noi diciamo che l'*Echinococco è fertile*. Queste vescicole, unite per un peduncolo molto delicato alla vescicola primitiva, che prendono il nome di *vescicole* o *capsule proligere*, hanno la disposizione degli strati invertiti in guisa che lo strato cuticolare, sottile, è interno e il parenchimale è esterno. Ciascuna di esse per un processo di gemmazione produce nel suo interno da venti a trenta piccoli scolici che per lo più si presentano invaginati ed attaccati anch'essi per un picciuolo sottilissimo.

Se la fragilissima membrana che li racchiude viene a rompersi questi piccoli scolici invaginati o no divengono liberi nel liquido (fig. 286).

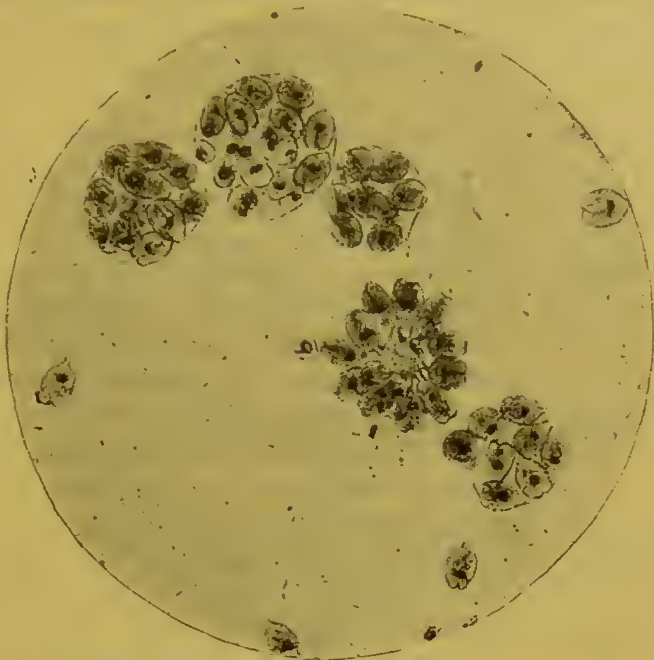


Fig. 286. — Vescicole proligere di Echinococco e scolici liberi (dal vero).

Allora essi si presentano come dei piccoli corpicciuoli ovoidi trasparenti, che misurano 200 μ per 110 μ, nella cui parte centrale fanno vedere



Fig. 287. — Scolici di Echinococco invaginati e svaginati (dal vero).

bene le ventose e la doppia corona di uncini la quale, a debole ingrandimento, si presenta sotto forma di una linea trasversale, mediana, oscura, rifrangente (fig. 287). Questi uncini sono in numero di 36-38, disposti in due serie

ed hanno grandezza diversa: i più grandi misurano 27-30 e i più piccoli 18-23 μ. Qua e là sparsi nell'interno dello scolice invaginato si vedono numerosi corpuscoli calcarei di forma ovale ed assai rinfrangenti.

Quando lo scolice è svaginato si vedono molto bene le quattro ventose in mezzo alle quali è un rostro corto e globoso cui si attacca la doppia corona di uncini.

Questi però aderiscono debolmente al rostrello, cadono con grande facilità e si trovano molto frequentemente liberi entro al liquido cistico insieme agli altri che vengono messi in libertà per la distruzione di qualche scolice.

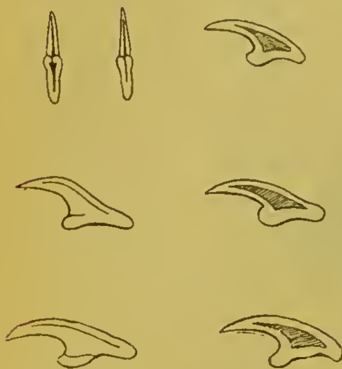


Fig. 288. — Uncini di *Taenia echinococcus*.

Essi sono variabilissimi di forma essendo questa dipendente dall'età che ha lo scolice, però può ben affermarsi che non perdono mai la loro caratteristica: quella cioè di essere molto somiglianti a spine di rosa a base assai larga, con una guardia brevissima e molto grossa ed un manico molto corto e tozzo, che può quasi venire a mancare se appartengono a scolici giovani (fig. 288).

Ma lo sviluppo di un Echinococco spesso non si limita alla formazione delle vescicole proligere e degli scolici che abbiamo descritto.

Avviene invece molto frequentemente che nell'evoluzione dell'idatide piccole parti della membrana parenchimale, sotto forma di ammassi granulosi, vengono a trovarsi fra lamina e lamina della membrana cistica.

Siccome esse hanno le stesse proprietà accrescitive e gemmanti della membrana parenchimale donde ebbero origine, avranno un accrescimento lento e progressivo. Si verrà a formare anche nell'interno di esse una cavità cistica e si rivestiranno all'esterno di una membrana stratificata di guisa che con il progressivo sviluppo prenderanno l'aspetto della vescicola madre.

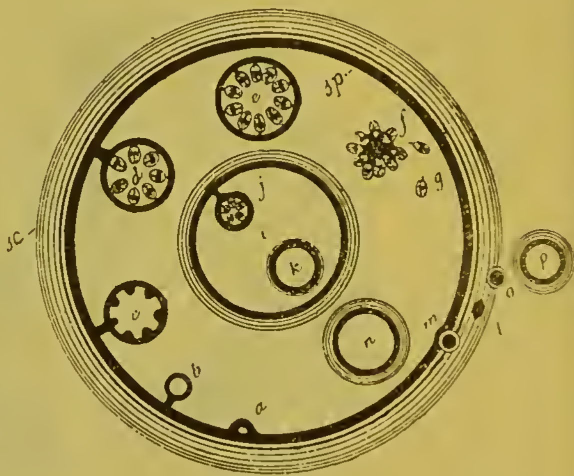


Fig. 289. — Schema di cisti di Echinococco: *sc*, strato cuticolare; *sp*, strato proligero: *a*, *b*, , *d*, *e*, *f*, vescicole proligere in varie fasi di sviluppo; *g*, scolice; *l*, *m*, *o*, formazione di vescicole figlie; *p*, vescicola figlia esogena; *n*, *i*, vescicole figlie endogene; *j*, vescicola prolígera con scolice nata da vescicola figlia; *k*, vescicola nepote.

Per la somiglianza strutturale con essa, per le stesse proprietà che hanno di produrre nel loro interno nuove vescicole proligere vennero chiamate *vescicole secondarie* o *vescicole figlie*.

Queste, che fino a quando sono all'inizio del loro sviluppo si trovano fra una lamella e l'altra nella membrana cuticolare della vescicola madre, coll'aumento del loro sviluppo fanno sporgenza all'esterno o all'interno di essa e finiscono poi coll'isolarsi completamente e cadere o all'esterno tra la membrana cuticolare

della vescicola madre e quella pericistica di connettivo, formata a spese dell'ospite (*Echinococcus granulosus exogenus, vescicole figlie esogene*) oppure cadere libere nel liquido della cisti madre (*Echinococcus endogenus, vescicole figlie endogene*). Queste alla loro volta possono generare e nuove vescicole proligere e vescicole nepoti esogene ed endogene, come pure possono rimanere sterili (fig. 289).

Un nuovo processo di accrescimento fu messo in evidenza dal Devé ed è il seguente:

Uno scolice, comunque derivi, può, sotto speciali condizioni e per trasformazione idropica, ingrandire, divenire vescicoloso, fertile ed acquistare in seguito la struttura della vescicola madre generando alla sua volta vescicole figlie endogene od esogene, nuove vescicole proligere e nuovi scolici.

Riassumendo quindi il ciclo evolutivo normale della Tenia echinococco sarà il seguente:



Da quanto si disse risulta che l'echinococcosi si svilupperà se un embrione esacanto, espulso con le proglottidi mature dall'intestino del cane, sarà introdotto in un modo qualsiasi nell'organismo dell'uomo o degli altri animali in cui può vivere la forma larvale.

Nell'uomo può giungervi: o con le acque, con le erbe, frutta, ecc.; oppure per il tramite stesso dei cani. Questi infatti, possono avere la lingua, le labbra od il loro pelame imbrattati con le oncosfere che hanno raccolto addentando le proglottidi che restano aderenti sul loro contorno anale, oppure

annusando e leccando tale regione ad altri cani infetti. È quindi assai facile che questi animali baciati od accarezzati dai loro padroni siano in grado di lasciare o sulle labbra o sulle mani di questi uova di Tenia, le quali ingoiate possono determinare la malattia.

Generalmente la cisti echinococcica è unica. Non è raro però il caso di trovarne un maggior numero situate sia nello stesso organo, sia in organi diversi. Se nello stesso organo ciò può dipendere 1° dal fatto che lo stesso individuo subì una infestazione multipla ingerendo cioè o simultaneamente o ad intervalli più o meno distanti fra loro più oncosfere le quali si localizzarono una vicino all'altra; 2° per formazione di vescicole figlie che si staccano dalla cisti madre, e sviluppano attorno ad essa (echinococcosi granulosa esogena); 3° per trapianti locali che avvengono in seguito a rottura spontanea della cisti o in seguito a trauma od atto operativo (echinococcosi granuloso-traumatica). Quando invece l'echinococcosi si riscontra contemporaneamente in organi diversi e lontani ciò può essere avvenuto: 1° per infestazione multipla; 2° per trasporto dei germi attraverso il sistema circolatorio (echinococcosi secondaria embolica o metastatica). In questo ultimo caso difficilmente si può ammettere che sieno trasportate in circolo le cisti figlie o cisti nepoti, le quali si staccano dalle rispettive cisti madri quando hanno già un discreto volume, ma bisogna ritenere che questa metastasi avvenga per il trasporto a distanza di *scolici viventi*, messi in libertà per la rottura spontanea, traumatica o chirurgica della cisti madre. Essi, subendo nel luogo ove furono trasportati una trasformazione idropica, divengono vescicolosi, prendono la struttura delle cisti figlie e divengono fertili. (Devé).

In ogni modo l'Echinococco, sia esso unico o multiplo, primitivo o secondario ha una durata vitale variabilissima e non sono rari i casi in cui le cisti vissero per più di 20 anni. Spesso però ad abbreviare questa lunga vita sorgono dei fatti che ne rallentano gli scambi nutritivi, per cui esso cessa di crescere, subisce delle trasformazioni regressive e muore:

a) per l'*estrema distensione della cisti*, o per un *trauma esterno* che possono determinarne la rottura. A seconda del punto ove il contenuto cistico si versa, si avranno nell'uomo conseguenze diverse, quali:

1° la guarigione spontanea, se il vuotamento si fa per una via che comunica direttamente o indirettamente con l'esterno (Echinococco che si apre una via attraverso il tubo digerente, la vescica, i bronchi, ecc.);

2° intossicazione più o meno lunga e grave se il contenuto si versa in una cavità sierosa (pleura, peritoneo);

3° morte subitanea quando per la rottura della cisti gli scolici o le piccole vescicole proligere, penetrando nel sistema circolatorio, vanno a determinare embolia;

b) per la *suppurazione della cisti* che segue la suppurazione del tessuto pericistico ed è consecutiva alla infiammazione stabilitasi in sito per il trasporto in circolo di germi piogeni. L'Echinococco muore in conseguenza di ciò, ma il malato subisce tutte le gravi conseguenze di questo pericoloso processo infettivo;

c) per la *morte naturale* dell'Echinococco, che può avvenire per degenerazione caseosa, grassosa e per infiltrazione calcarea. È questa la terminazione più fortunata giacchè la cisti, a poco a poco impiccolisce e del suo volume primitivo non resta che un nodulo più o meno grande, la cui na-

tura parassitaria è messa in evidenza dall'esame microscopico, il quale spesso lascia vedere qualche residuo cuticolare, spessissimo i caratteristici uncini.

La diagnosi dell'Echinococco è molto difficile all'inizio. Riesce invece più facile quando esso ha acquistato delle dimensioni considerevoli. Ciò non toglie però che molte volte possa confondersi con altre malattie, specialmente quando risiede in regioni profonde, poco accessibili alla percussione ed alla palpazione.

In ogni modo essa si basa sui seguenti segni:

1° *Fremito idatideo.* Alla palpazione si sente sotto alle dita un rumore speciale, caratteristico, simile a quello che si ha comprimendo della neve, che è dovuto all'elasticità della parete, allo sfregamento delle lamelle cuticolari, od all'urto che le vescicole figlie fanno una contro l'altra.

2° *Eosinofilia.* Nei malati di tumori idatidei si è riscontrata la presenza di eosinofili nella proporzione del 7-20 e, qualche rara volta, anche del 40 %.

3° *Impenetrabilità ai raggi X.* Con essi quindi si potrà diagnosticare anche la sede e l'estensione precisa del tumore cistico.

4° *Esame fisico-chimico del liquido cistico estratto con puntura esplorativa.* Normalmente esso è limpido, chiaro o leggermente opalino: non si coagula al calore, possiede una gran proporzione di cloruro sodico. Quando però il liquido cistico è anormale, esso può presentarci alterazioni di colore: diviene brunastro in seguito alla presenza di pigmenti sanguigni, o verdastro e giallastro se contiene della bile; perde la sua limpidezza e fluidità, facendosi opaco e denso, quando la cisti è in via di degenerazione grassa; assume un colorito giallo ed ha un odore sanioso quando è sopraggiunta una suppurazione.

5° *Esame microscopico del sedimento.* Se il liquido cistico è abbandonato a sè per qualche tempo, o meglio se viene centrifugato, nel fondo del tubo si forma un deposito biancastro. La presenza in esso di frammenti di membrana cuticolare, di scolici od anche semplicemente di uncini formerà il criterio *più sicuro* per la diagnosi. Anzi si può dire che la presenza, anche di un solo uncino, costituisce già una assoluta garanzia diagnostica. Infatti gli uncini soli per la loro natura chitinosa resistono e non subiscono alterazioni in seguito ai vari processi degenerativi.

6° *Siero-diagnosi:*

a) con la ricerca delle precipitine specifiche;

b) con la deviazione del complemento.

Per la profilassi vedi *Epidemiologia.*

Echinococcus multilocularis. — Come appendice, a quanto riguarda l'Echinococco, occorre accennare brevemente ad un'altra forma che prende il nome di *echinococcosi multiloculare* (cisti idatide alveolare, echinococcosi alveolare, echinococcosi bavaro-tirolese), la quale non può nè deve confondersi con l'echinococcosi granulosa esogena, che è conseguenza della produzione straordinaria di cisti figlie e nepoti derivanti tutte in origine da una unica cisti madre di *Echinococcus polymorphus.*

L'echinococcosi multiloculare è una malattia parassitaria ben definita. Considerata dapprima come un tumore (*Colloide alveolare,* Bhül, 1852), fu poi dal Zeller e dal Virchow riconosciuta di origine parassitaria e chiamata

tumore da Echinococco a tendenza ulcerosa (1855). È stata riscontrata in molti organi.

La produzione parassitaria può giungere alla grandezza della testa di un bambino e si presenta come una massa di consistenza cartilaginea, la cui superficie è irregolarmente bernoccoluta.

Il tumore non ha limiti netti, ciò che lo differenzia sia dall'echinococcosi umana come dalla echinococcosi pseudo multiloculare dei bovini.

Al taglio si notano numerose, piccole cavità, scavate in un tessuto duro fibroide, che ci presenta qua e là delle macchie rossastre o brune, dovute all'accumulo di pigmenti biliari e cristalli di ematoidina.

Le piccole cavità hanno la parete interna tappezzata da uno strato granuloso o granulo-grassoso di colorito giallastro. All'interno poi si riscontrano delle vescicolette gelatinose che corrispondono alle vescicole echinoccciche, poichè posseggono una cuticola striata, ricca di sali calcarei e nell'interno di esse si trovano uncini, i quali però non sono costanti e, quando esistono, solamente in poche si possono riscontrare.

È singolare che questa forma di Echinococco ha una grande tendenza all'ulcerazione, la quale origina dalla regione centrale. Qui si forma una cavità, spesso molto grande, ripiena di un liquido che somiglia a pus giallo-verdastro, verde-bruno o brunastro in mezzo al quale si riscontrano brandelli della parete, corpuscoli calcarei, vescicole d'Echinococco alterate, uncini, goccie di grasso, cristalli di ematoidina, di colesterina, margarina.

La sua sede prediletta è il fegato, nel quale generalmente è limitato nettamente dal parenchima epatico.

La distribuzione geografica è molto ristretta e comprende due centri principali: uno in Russia, l'altro nel Tirolo. Württemberg e Baviera. Casi qua e là isolati si sono riscontrati in Francia, Germania centrale, Baden, Alsazia. In Italia furono descritti con sicurezza due casi: il primo dal dott. Bruni di Verona, nel 1880, che in una giovane di 19 anni riscontrò un enorme tumore del fegato, la cui incisione dette esito a ben 600 gr. di pus insieme a brani di sostanza d'aspetto gelatinoso; il secondo dal prof. Nazari di Roma in un uomo di 76 anni da Casagiove (Caserta) il quale all'autopsia presentava l'Echinococco alveolare nella convessità del lobo destro del fegato.

Sebbene molti autori ritengano che l'*Echinococcus polymorphus* e l'*Echinococcus multilocularis* siano due forme larvali identiche o al massimo che questa debba considerarsi come una forma sviluppatasi in modo anormale, sia per il raduno di più oncosfere in un solo punto, sia per la penetrazione di un solo embrione entro i vasi linfatici e i capillari biliari, sia per particolarità del tessuto epatico, pure molti credono che le due forme siano nettamente distinte fra loro. I sostenitori di questa teoria si fondano:

1° sulla forma speciale che ha la Tenia adulta la quale differirebbe dalla Tenia echinococco comune per la lunghezza dello strobila, per la forma, larghezza e numero degli uncini; per la forma dell'utero ripieno di uova (Mangold, Müller);

2° sulla riproduzione dell'echinococcosi alveolare in seguito all'ingestione di queste speciali Tenie (Mangold);

3° sul fatto che i cani nutriti con tumori alveolari si infestano di numerosi esemplari di Tenia specifica (*T. echinococcus alveolaris*);

4° sulla costituzione istologica e sul modo di accrescersi dell'Echinococco alveolare.

Credo però che la questione debba essere studiata ancora prima di dichiararsi completamente risoluta. In ogni modo la profilassi di questa forma speciale rientra in quella dell'Echinococco polimorfo.

Fam. Bothriocephalidae.

I Cestodi che appartengono a questa famiglia posseggono due fessure (botridi) longitudinali le quali si estendono per tutta la lunghezza dello scolice ed hanno le funzioni di ventose. Le aperture sessuali si trovano sulla faccia ventrale delle proglottidi nella linea mediana. Il canale deferente e l'apertura vaginale sboccano separatamente in uno stesso poro genitale il quale si trova avanti ad un'altra apertura che costituisce lo sbocco dell'utero od orificio di parto (tocostoma). I vitellogeni si trovano ai lati delle proglottidi (fig. 290).

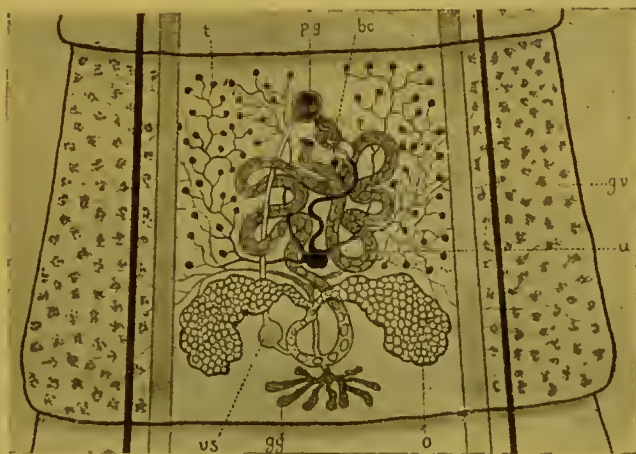


Fig. 290. — Schema dell'organizzazione interna di *Bothriocephalus*: *pg*, poro genitale; *bc*, borsa del cirro; *t*, testicoli; *gv*, glandole vitellogene; *u*, utero; *o*, ovaia; *gg*, glandola del guscio: *vs*, vescicola seminale.

Le uova che vengono deposte, quando sono mature e fecondate, hanno guscio sottile e ad uno de' poli sono munite di un operculo. L'oncosfera (embrione esacanto), che si forma parecchi giorni dopo la evacuazione delle uova, è racchiusa entro un embriouoforo munito di lunghe ciglia vibratili, le quali, una volta uscita dall'operculo, le servono per nuotare liberamente nell'acqua di guisa che l'ospite intermedio, che è un animale acquatico, possa più facilmente ingerirla.

Una sola specie interessa a noi in modo speciale, il *Bothriocephalus latus*, giacchè il *B. cordatus* e il *Diplogonoporus grandis* che vivono generalmente nei mammiferi acquatici (pinnipedi e cetacei), si riscontrarono solo rarissimamente nell'uomo.

Bothriocephalus latus (Bremser, 1819).

Fra i Cestodi dell'uomo è senza dubbio quello che può raggiungere la maggiore lunghezza (3-9 metri). Questo è dovuto principalmente al fatto che

in esso le proglottidi mature non si staccano quando l'utero è ripieno. Le uova sono espulse dal poro uterino e si riscontrano sempre nelle feci dell'ospite, mentre le proglottidi vuote restano attaccate a tutte le altre che

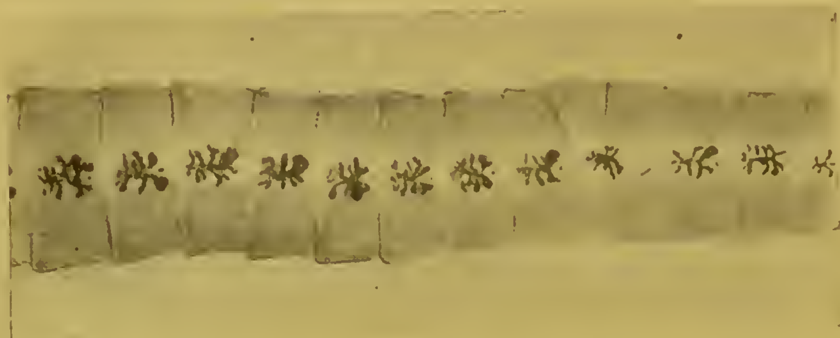


Fig. 291. — Proglottidi mature di *Bothriocephalus latus* (dal vero).

formano lo strobila, venendo così a formare come una specie di coda raggrinzita e deformata.

La testa è a forma di mandorla, allungata e appiattita, e misura 2-3 mm. di lunghezza per una larghezza di un millimetro.

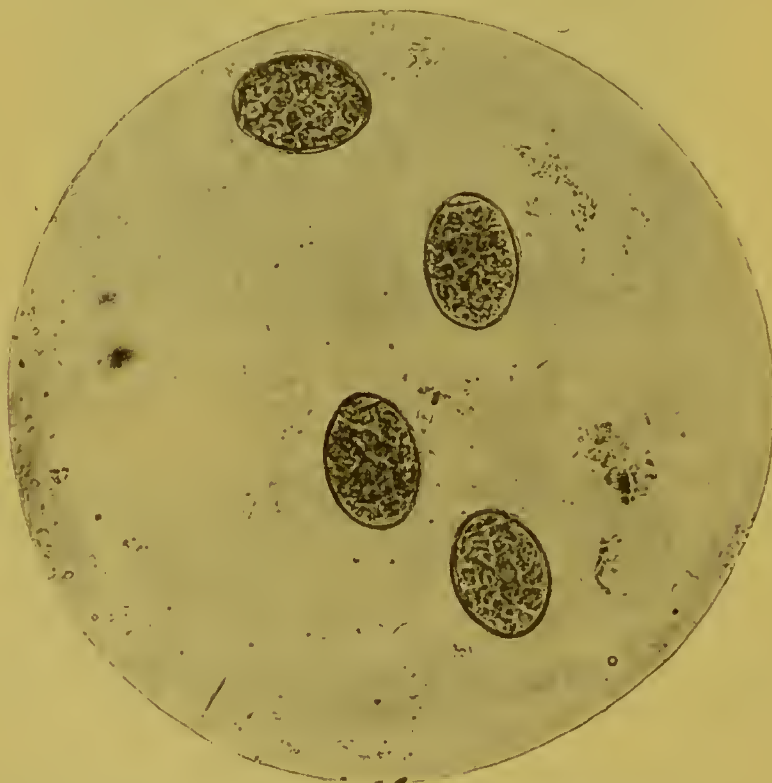


Fig. 292. — Uova di *Bothriocephalus latus* (dal vero).

Essa è percorsa in tutta la sua estensione da due profonde fessure longitudinali o *botridi*, uno dorsale ed uno ventrale, ma che effettivamente vengono a trovarsi laterali per una costante torsione del collo, che è sottile e più o meno lungo secondo lo stato di contrazione. Da principio liscio,

presenta ben presto delle strie superficiali che diventano poi profonde, limitando le proglottodi, le quali sono sempre più larghe che lunghe in tutta la lunghezza dello strobila. Questo può essere formato da 3000 o 4000 proglottidi che divengono sempre più larghe quanto più si allontanano dal collo e possono raggiungere la lunghezza di 5-6 mm. con una larghezza di 12-18 mm. I pori genitali sono situati sulla linea mediana della faccia ventrale e contribuiscono insieme con l'utero tuboloso, ravvolto su sè stesso e pieno di uova dal guscio oscuro, a far sembrare il centro di ogni proglottide di colore brunastro, di guisa che l'insieme di tutte queste macchie dànno l'illusione che quasi tutto lo strobila sia percorso da una linea bruna (fig. 291).

Le uova che, come abbiamo detto, si riscontrano sempre nelle feci, sono ovali, hanno guscio sottile, son munite di operculo ad uno dei poli e misurano μ 68-70 × 44-45 (fig. 292). Disseminate alla superficie del suolo, sono trasportate con le acque piovane od alluvionali nei ruscelli, nei fiumi, nei laghi o nel mare. Dopo qualche giorno, da che l'uovo si trova nell'ambiente adatto, si viene a formare nell'interno di esso l'embrione, che è costituito da una parte centrale, armata di sei uncini e formata da grosse cellule e da un rivestimento esterno di altre cellule che posseggono lunghe ciglia vibratili (fig. 293).

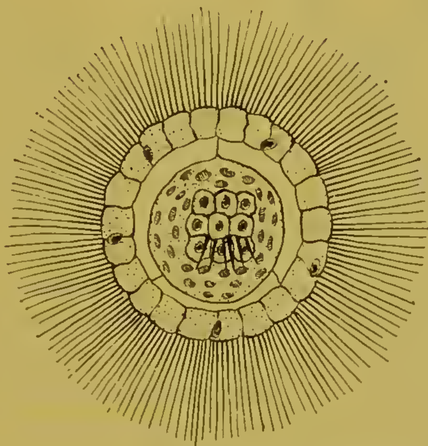


Fig. 293. — Embrione cigliato di *Bothriocephalus latus*.

Quando l'embrione è così costituito si apre l'operculo ed esso vien fuori, nuota liberamente nell'acqua e penetra forse dapprima in un ospite e da questo poi nel corpo di un pesce (luccio, trota, ecc.). Penetrato in esso va a localizzarsi entro sorta di canali scavati sia nei visceri, sia nei muscoli, ove si trasforma in una forma larvale che prende il nome di *Plerocercoide*.

Questa larva somiglia ad un piccolo verme biancastro lungo 1-2 cm. Se non è in uno stato di contrazione ci presenta uno scolice con due botridi ed un corpo leggermente striato in senso trasversale. Se una di queste larve giunge viva nell'intestino dell'uomo, come i Cisticerchi delle Tenie, si fissa alla mucosa intestinale e si trasforma in Botriocefalo adulto. Cresce da 8 a 9 cm. al giorno e dopo un mese circa dall'ingestione si possono già riscontrare le caratteristiche uova operculate nelle feci dell'ospite.

Il ciclo evolutivo può riassumersi nello schema seguente:



Perchè l'uomo quindi non si infesti è necessario che non vengano mangiati i visceri o le carni dei pesci infestati da Plerocercoidi, o per lo meno che questi non vi giungano vivi. Ciò si può ottenere in più modi: 1° con l'ebollizione prolungata per 10 minuti primi; 2° con la salagione; 3° mantenendo il pesce ad una temperatura compresa fra + 1° — 3° per almeno due giorni; 4° mettendo sotto aceto il pesce.

La distribuzione geografica del Botriocefalo è in rapporto con la presenza degli ospiti intermedi, i più comuni de' quali sono il luccio (*Esox lucius*), la trota (*Trutta vulgaris* e *T. lacustris*), il salmone (*Salmo umbla*), la perca (*Perca fluviatilis*), la lota (*Lota vulgaris*), il coregono (*Coregonus luvaretus* e *C. albula*).

In Europa è distribuito in due centri ben distinti: un centro russo ed uno svizzero.

Il centro, così detto russo, comprende la Prussia orientale fino alla Vistola e tutte le regioni che dalla Lituania vanno alla Lapponia e che formano i golfi di Riga, Finlandia e Botnia. Da qui si estende alle coste orientali della Svezia e manda al sud-est delle propaggini nella Polonia e fino alla Romania, ed all'ovest verso la Danimarca, l'Olanda, il Belgio ed il nord della Francia, sebbene in queste ultime regioni non sia troppo frequente.

Dal centro svizzero il *Botriocefalo* si diffonde poi nella Francia meridionale, nel Piemonte e Lombardia.

In Italia, oltre che nella Lombardia e nel Piemonte, che costituiscono per noi il centro Italico, il Botriocefalo fu rinvenuto in Fiesole dal Guidetti ed in Napoli dal Delle Chiaie, ma nè l'uno nè l'altro fanno cenno se gli individui che espulsero il parassita si fossero mai mossi dalla loro residenza.

Per contrario io posso assicurare di averlo rinvenuto in un cane giovane che si infestò senza dubbio in Roma mangiando lucci della nostra provincia e precisamente del lago di Bracciano (1). Il caso finora è rimasto isolato, ma ciò non toglie che ci si debba domandare: come mai può essersi verificato questo? come può esservi stato importato? potrà diffondersi e rendersi comune fra noi?

Il fatto che prima di allora non fu notato alcun caso (le attestazioni dei medici esercenti nelle città bagnate dai nostri laghi lo dimostrano) prova che l'infestazione de' pesci provenienti dal lago di Bracciano è recente. A mio avviso ciò deve essere in relazione soprattuto con l'istituzione del Poligono di tiro di artiglieria nella stessa città di Bracciano, per cui là convengono soldati di ogni parte d'Italia e fra questi con ogni probabilità qualche lombardo o piemontese, che per caso era affetto da Botriocefalo e che purtroppo importò fra noi il parassita.

Circa poi alla possibilità di rendersi comune, credo che ciò sia difficile, data l'abitudine che tutti fra noi hanno di non mangiare mai pesce poco cotto. Però la facilità con cui possono infestarsi i cani, specialmente quelli che i pescatori tengono sempre vicini, e ai quali dànno spesso come nutrimento i pesci o i loro visceri, ne deve mettere sull'avviso e cominciare fin da oggi a considerare il Botriocefalo fra i possibili Cestodi della nostra provincia.

Il Botriocefalo spesso si rinviene insieme alla *Taenia solium* o alla *T. saginata* e qualche volta in più esemplari nello stesso individuo. Così il Roux cita il caso di una giovane che in una sol volta espulse 90 parassiti; il Della Chiaie narra che un ufficiale svizzero emise due Botriocefali; E. Parona ne raccolse tre in un individuo; il Perroncito due in un cuoco; il Ronchetti sette in una cameriera ed io stesso nel caso suaccennato ne potei raccogliere all'autopsia ben 25 esemplari.

Da quanto si è esposto sino ad ora risulta evidente come sieno netti i caratteri de' Cestodi e come se ne renda facile la diagnosi differenziale.

Però non sempre si può avere nelle mani il Verme intero; anzi, il più delle volte, la diagnosi stessa si deve formulare o su una sola proglottide matura o sulla sola testa. Credo quindi opportuno riassumere nelle tabelle seguenti i caratteri principali degli scolici e degli anelli maturi de' Cestodi, che più comunemente si rinvengono nell'intestino umano.

(1) ALESSANDRINI. *Bothriocephalus latus*, Bremser *nella provincia di Roma*. Bullett. R. Accademia medica di Roma. Anno XXXII, fasc. VII-VIII, 1906.

I. *Diagnosi de' Cestodi parassiti dell'uomo secondo la struttura degli scolici.*

- Scolice
  - armato di uncini
    - su una fila
      - in numero di 8 . . . . . . *H. lanceolata*
      - in numero di 26 . . . . . *H. nana*
    - su due file
      - in numero di 90 . . . . . *D. madagascariensis*
      - in numero di 22 a 32. . . *T. solium*
    - su tre o quattro file . . . . *Dipylidium caninum*
  - inerme .
    - quattro ventose
      - con piccolo rostro invaginato - ventose piccole, profonde, muscolose - collo largo. . . . . *H. diminuta*
      - senza rostro - con depressione fra le ventose larghe, pigmentate di nero - collo affilato . . . . . . *T. saginata*
    - due botridi
      - scolice ovalare a mandorla. *B. latus*
      - scolice cordiforme. . . . . *B. cordatus*

II. *Diagnosi de' Cestodi parassiti dell'uomo secondo la forma degli anelli maturi.*

- Anello con pori genitali
  - marginali
    - due per anello . . . . *Dipylidium*
    - uno per anello
      - alterni. . . . . *Taenia*
      - unilaterali
        - uova sparse uniformemente nella proglottide . . . . *Hymenolepis*
        - uova a gruppi entro capsule . . . . *Davainea*
  - mediani
    - un poro per ogni anello - scolice con 2 botridi . . . . *Bothriocephalus*
    - due per ogni anello. . . . . *Diplogonoporus*

TABELLA 94 *Tavola comparativa de' caratteri differenziali dei Cestodi più comuni.*

	Taenia solium	Taenia saginata	Bothriocephalus latus
Scolice	globoso - (1 mm.) - 4 ventose rotondeggianti munito di rostello con 24-30 uncini in doppia fila.	piriforme - (2 mm.) - 4 ventose ellittiche pigmentate di nero - nè rostro, nè uncini - depressione anteriore simulante una 5ª ventosa centrale.	oblungo a mandorla - (2-3 mm.) - 2 botridi uno dorsale, uno ventrale.
Collo	sottile - liscio - filiforme.	lungo - affilato - metà più stretto della testa.	variabile per lunghezza - liscio.
Lunghezza	2-3 metri - 700 a 1000 anelli.	4-8 metri - 1200-1500 anelli.	5-9 metri - 3000-4000 anelli.
Anelli maturi	più lunghi che larghi - 10-12 $\times$ 5-7 mm. - espulsi per frammenti di catena insieme con le feci - immobili.	più lunghi che larghi - 15-20 $\times$ 6-10 mm. - anelli che possono espellersi isolatamente e indipendentemente dalla defecazione - mobili - contrattili.	più larghi che lunghi - 5-6 $\times$ 10-18 mm. - espulsi in lunghi frammenti di catena - gli anelli maturi, vuotati di uova, si raggrinzano e formano come una coda del verme.
Pori genitali	laterali - per lo più regolarmente alterni.	laterali - irregolarmente alterni.	mediani - ventrali.
Utero	ramificato - a fondo cieco - le ramificazioni dendritiche, poco numerose, occupano tutto l'anello - 5-13 per lato - accumuli maggiori di uova nelle estremità.	ramificato - a fondo cieco - le ramificazioni dicotomiche numerose occupano tutto l'anello - 20-28 per lato - ugualmente riempite di uova.	tubuloso - ravvolto su sè stesso disposto nel centro dell'anello a rosetta - con apertura di parto.
Uova	sferiche - guscio sottile fragilissimo - contenenti un embrionoforo rotondeggiante di 30-36 μ - espulse con le proglottidi.	ovalari - guscio sottile fragilissimo - contenente un embrionoforo ovalare di 30-40 $\times$ 20-33 μ - espulse con le proglottidi.	ovoidi con guscio bruno, sottile, resistente, operculato - 63-70 $\times$ 42-45 μ - si rinvengono nelle feci.

Segue *Tavola comparativa de' caratteri differenziali dei Cestodi più comuni.*

	Dipylidium caninum	Hymenolepis nana	Hymenolepis diminuta
Scolice	armato di un rostro retrattile con 3-4 fila di uncini caduchi a forma di spina di rosa.	armato di rostro retrattile con una sola fila di 20-30 uncini.	con depressione infundibuliforme e rostro rudimentale inerme.
Collo	sottile - corto.	sottile - assai lungo.	lungo - largo metà della testa.
Lunghezza	10-15 centimetri.	10-15 millimetri.	20-60 centimetri
Anelli maturi	più lunghi che larghi - a forma di semi di zucca.	sempre più larghi che lunghi, occupati interamente dall'utero.	sempre più larghi che lunghi, occupati interamente dall'utero.
Pori genitali	doppi - uno per lato.	unilaterali tutti dal lato sinistro.	unilaterali a sinistra.
Utero	a forma di rete nelle cui maglie sono i testicoli - la rete poi si trasforma in sacchetti contenenti le uova.	occupa tutta la proglottide.	occupa tutta la proglottide.
Uova	rotonde - 35-40 μ chiuse in capsule ciascuna delle quali ne contiene 8-20 - embrione di 25-30 μ.	ellittiche con tre membrane - la più interna presenta a ciascun polo un mammellare piccolissimo - 30-50 μ.	ovalari - con tre membrane, di cui la più interna ha due mammelloni polari - 60-80 μ.

2° Ord. **Trematodi.**

Sono de' Platelminti a corpo nudo, non segmentato, generalmente di aspetto fogliaceo. Hanno un tubo digerente incompleto, giacchè manca di ano. La bocca è situata anteriormente nel fondo di una ventosa (τρηματώδης, perforato).

I Trematodi parassiti dell'uomo appartengono tutti al sottordine dei

Distomi.

Questi sono costantemente muniti di due ventose, delle quali una è sempre anteriore e l'altra è situata ventralmente, oppure posteriormente: alla ventosa anteriore o boccale segue un faringe muscoloso che si continua con un corto esofago.

Il tubo digerente che da questo si diparte è sempre diviso in due branche, semplici o ramificate, che terminano a fondo cieco.

L'apparato escretore è formato da una rete di più canalicoli, i quali sboccano in due canali laterali più grandi e contrattili, questi, nella parte posteriore del corpo si riuniscono in un tronco mediano unico che nella parte terminale può rigonfiarsi in una vescicola pulsatile, la quale sbocca in un poro escretore (forame caudale).

I Trematodi sono per la massima parte ermafroditi. Gli organi genitali sono complessi. I maschili sono costituiti da due testicoli variabili assai per forma, i quali si continuano con due spermidutti che sboccano in una vescicola seminale.

Da qui il liquido spermatico si versa nel poro genitale per mezzo di un cirro o pene, munito o no della borsa del cirro.

L'apparato genitale femminile è costituito da un ovaio, cui segue un ovidutto ed un utero, la cui ultima porzione prende il nome di vagina, la quale sbocca nel poro genitale per una apertura vulvare. All'inizio dell'ovidutto esiste generalmente un ricettacolo seminale. In prossimità di questo si riscontrano gli sbocchi dei due vitellodutti, che portano all'uovo il prodotto delle glandole vitellogene situate ai lati del corpo, e lo sbocco della glandola del guscio (fig. 294).

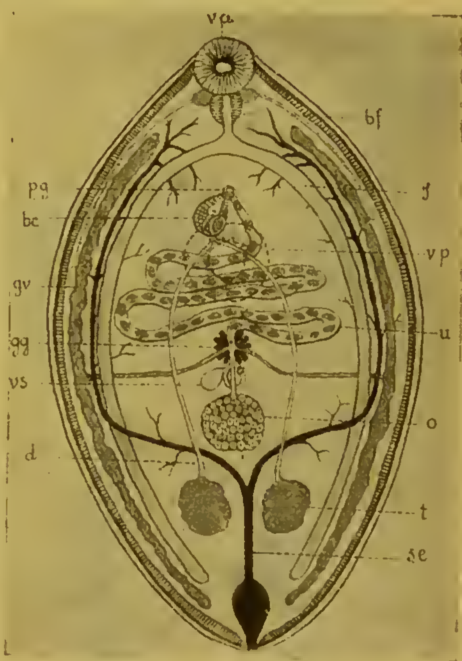


Fig. 294. — Organi interni di un Distoma: *va*, ventosa anteriore; *vp*, ventosa posteriore; *bf*, bulbo faringeo; *I*, intestino; *t*, testicoli; *d*, deferente: *bc*, borsa del cirro; *pg*, poro genitale; *u*, utero; *o*, ovaia; *vs*, vescicola seminale; *gg*, glandola del guscio; *gv*, glandole vitellogene; *se*, sistema escretore.

I Trematodi hanno un'evoluzione assai complicata, ma non di tutti è ugualmente nota. Noi, prenderemo come esempio quella del *Distoma hepaticum*, parassita comune del fegato delle pecore, dei buoi, ecc.

In questa specie le uova operculate sono emesse dai parassiti che vivono nei canali biliari e da qui con la bile giungono nell'intestino, donde vengono espulse con le feci.

Giunte nell'acqua, nell'interno di esse si sviluppano gli embrioni che solo dopo circa tre settimane escono dall'operculo e nuotano liberamente. Sono muniti di ciglia e prendono il nome di *miracidio*, *embrione ciliato* oppure *embrione infusoriforme* per la lontana somiglianza che hanno con qualche infusorio.

Questo embrione all'estremità anteriore, che è più larga, presenta nel mezzo un piccolo rostro e poco più sotto una macchia pigmentaria opaca ad *x* che si ritiene possa essere una macchia oculare. Uscito all'uovo il Miracidio misura 130 × 27 μ, e nuota liberamente nell'acqua alla ricerca di un ospite intermedio, che generalmente è un mollusco d'acqua dolce (*Limnaea*, *Planorbis*, *Paludina*, ecc.) (fig. 295) e, nel nostro caso, la *Limnaea truncatula* o *L. peregra*. Trovato l'ospite adatto si fissa dapprima col suo rostro al piede (organo locomotore) del mollusco stesso, poi penetra nello spessore dei suoi tessuti e giunge fino alla camera respiratoria. Qui subisce delle trasformazioni: perde dapprima le ciglia, ogni traccia di macchia oculare scompare e si trasforma in una specie di sacco ovoide, *sporocisti*, che può dividersi per scissione trasversale in altre sporocisti le quali racchiudono am-

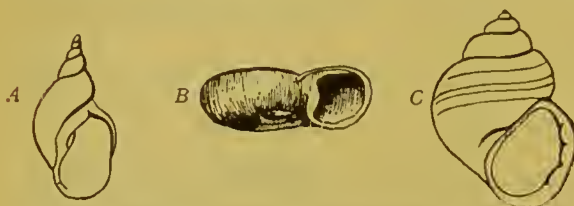


Fig. 295. — Ospiti intermedi di Distomi. *A*, *Limnaea*; *B*, *Planorbis*; *C*, *Paludina*.



Fig. 296. — Fasi di sviluppo di un Distoma. *A*, uovo; *B*, *C*, embrione ciliato; *D*, embrione fissato al piede di un mollusco; *E*, Sporocisti; *F*, Sporocisti con Redia; *G*, Redia. *H*, Redia con Cercarie; *I*, Cercaria; *K*, Cercaria in via d'incistamento; *L*, Cercaria incistata.

massi di cellule germinative. Queste alla lor volta si trasformano in morula e poscia per invaginazione in una gastrula da cui, progredendo nello sviluppo, originano altri organismi speciali, che si chiamano *Redie*. Queste sono allun-

gate, cilindriche e munite anteriormente di una bocca, seguìta da un faringe muscoloso e da un intestino semplice terminato a fondo cieco, e posteriormente di due appendici coniche, tozze, laterali, analoghe a membra rudimentali. Emigrano allora dalla camera pulmonare dell'ospite, penetrano nei varî organi, soprattutto nel fegato: si ingrandiscono e producono nel loro interno o *Redie figlie* o *Cercarie*. Quelle per lo più d'estate, queste d'inverno. Le Cercarie misurano 180-300 $\mu \times 130$ circa; hanno forma ovalare, appiattita e sono munite di due ventose (una anteriore, una ventrale) e di una lunga coda che serve loro di organo locomotore. Lasciano allora il corpo dell'ospite e nuotano nelle acque. In questo periodo possono essere ingerite dall'ospite definitivo oppure, se ciò non accade subito, si fissano con la ventosa ad un corpo sommerso od alle foglie di piante acquatiche e, perdendo la coda, si chiudono entro una cisti composta di sostanza mucilaginosa, che si indurisce a contatto dell'acqua e che viene segregata dalle glandole cistogene, situate ai lati del corpo (fig. 296). Sicchè, riassumendo, noi avremo il seguente ciclo:



Gli erbivori quindi ed accidentalmente anche l'uomo, s'infestano ingerendo le Cercarie con le acque o con le erbe dei prati ove furono trasportate dalle inondazioni e dove poterono fissarsi ed incistarsi.

In questo caso i succhi digestivi distruggono la cisti e il giovane Distoma che vi era rinchiuso, risalendo il coledoco, giunge ai canali biliari ove diviene adulto assai rapidamente.

I Distomi che comunemente si rinvengono parassiti dell'uomo possono appartenere a tre famiglie, che sono distinte dai seguenti caratteri:

Distomi con le ventose	una anteriore, una posteriore	. . . .	*Amphistomidae*
	una anteriore, una ventrale	ermafroditi . . .	*Fasciolidae*
		a sessi separati .	*Schistosomidae*

Fam. Amphistomidae.

Mentre più generi e specie di questa famiglia si rinvennero nello stomaco, intestino e fegato degli animali, due soli rappresentanti di essa si trovarono parassiti dell'uomo, il *Gastrodiscus* ed il *Cladorchis*, che si possono differenziare per i seguenti caratteri:

Ventosa posteriore	slargata a disco, più larga del diametro trasversale del corpo	*Gastrodiscus*
	un terzo più piccola del diametro trasversale posteriore del corpo.	*Cladorchis*

Tanto l'uno come l'altro vivono nell'intestino aderenti alla mucosa, ove sembra che determinino delle alterazioni accompagnate da diarrea più o meno intensa.

Gastrodiscus hominis (Lewis et Mac Connell, 1876) (fig. 297).

Piccolo Distoma lungo 6-8 mm. con una larghezza massima di mm. 8-4 di colorito rossastro, caratterizzato dall'avere una ventosa anteriore piccolissima ed apicale e la posteriore formata da un disco assai largo in guisa da dare al verme l'aspetto di corno da caccia; sul fondo di questo grande disco terminale si nota una piccola ventosa accessoria.

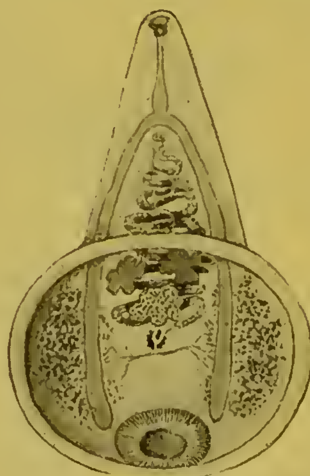


Fig. 297. — *Gastrodiscus hominis.*

Fu trovato nell'intestino crasso, cieco e colon, tre volte in India in individui, due dei quali morirono per colera, e due volte in Assam.

Cladorchis Watsoni (Conyngham, 1904) (fig. 298).

Ha un aspetto gelatinoso allo stato fresco ed ha forma di una pera cui sia stato tolto il picciuolo: di guisa che la ventosa anteriore piccolissima si

trova per lo più nascosta e come retratta; la posteriore invece è ventrale, subterminale e grande.

Il poro genitale è situato subito dopo la ventosa anteriore. Misura 8-10 mm. di lunghezza per 4-5 di larghezza.

È stato scoperto dal dott. Watson nell'intestino tenue di un negro nell'Africa occidentale tedesca. I parassiti aderivano alla mucosa e sembra che ad essi fosse dovuta l'intensa infiammazione dell'intestino e la diarrea per la quale soccombette il malato.

È abbastanza comune nella Nigeria del Nord, sopratutto nei bambini. Tanto del *Gastrodiscus* come del *Cladorchis* è sconosciuta l'evoluzione, la quale però con ogni probabilità si compie come quella del *Distoma hepaticum*.

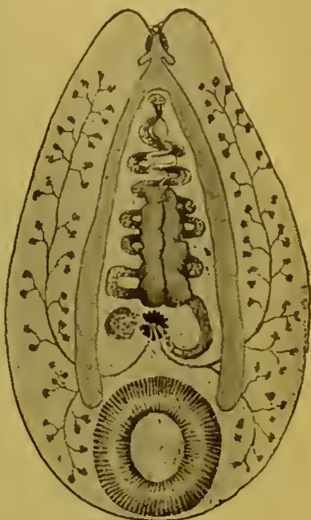


Fig. 298. — *Cladorchis Watsoni.*

Fam. **Fasciolidae.**

I vari generi appartenenti a questa famiglia sono caratterizzati quasi esclusivamente dalla forma e posizione degli organi genitali, di guisa che la classificazione può comprendersi nella seguente tavola sinottica:

Seno genitale	avanti la ventosa ventrale	tubo digerente ramificato				*Fasciola*
		tubo digerente biforcato	testicoli avanti l'apparato genitale ♀			*Dicrocoelium*
			testicoli dietro l'apparato gen. ♀	borsa del cirro presente		*Fasciolopsis*
				borsa del cirro assente	testicoli ramificati	*Clonorchis*
					testicoli lobati	*Opistorchis*
					testicoli ovoidi	*Metorchis*
	dietro la ventosa ventrale - testicoli	frastagliati - corpo globoso				*Paragonimus*
		compatti - corpo appiattito				*Heterophyes*

Le specie che vivono parassite dell'uomo non occupano tutte la stessa sede ma vivono e furon ritrovate in organi diversi ove determinano le più svariate forme di malattie, le quali prendono genericamente il nome di *distomatosi*. Cosicchè abbiamo una *distomatosi bucco-faringea* od *halzoun*, una *distomatosi epatica*, una *intestinale*, una *cerebrale* ed una *pulmonare* od *emottisi parassitaria*. Il modo di comportarsi di queste specie può riassumersi nella seguente

TABELLA 95.

Parassita	Sede	Ospite	Distribuzione geografica	Evoluzione
Fasciola hepatica . .	faringe	uomo	Regione del Libano. . .	varie specie del gen. *Limnaea*
» »	fegato	pecore - buoi - capre - maiali - uomo	cosmopolita	
Dicrocoelium lanceatum	fegato	pecore - buoi - capre - maiali - uomo	cosmopolita	*Planorbis marginatus*
Clonorchis sinensis. .	fegato	gatto - cane - uomo	Cina, Giappone, India, Corea, Bengala, Tonchino	sconosciuta
Opistorchis felineus .	fegato	gatto - cane - uomo	Giappone, Siberia, Russia, Svezia, Prussia orientale, Olanda, Francia, Italia	*Leuciscus rutilus* - *Idus melanotus*
Opistorchis noverca. .	fegato	cane - uomo	Calcutta	sconosciuta
Metorchis truncatus .	fegato	cane - volpe - foca - uomo	Tomsk, Siberia	sconosciuta
Fasciolopsis Buski. .	intestino	uomo	Cina	sconosciuta
Heterophyes heterophyes	intestino	uomo	Egitto	sconosciuta
Paragonimus Westermanni	polmoni - cervello	tigre - gatto - cane - uomo	Asia orientale (Cina, Giappone, Corea)	sconosciuta



Fig. 299. — *Fasciola hepatica*.

Fasciola hepatica (Lin.) (fig. 299).

Il suo corpo è appiattito, fogliforme, di colorito bruno pallido; in avanti dapprima è allargato, poi ristretto bruscamente in guisa da formare un prolungamento che va col nome di prolungamento cefalico. La ventosa anteriore, piccola, rotonda, terminale; la posteriore, più grande con apertura triangolare.

Esofago assai corto. Tubo digerente molto ramificato, come pure ramificati assai sono l'apparato genitale maschile e il vitellogeno. Il seno genitale è situato poco all'innanzi della ventosa ventrale e ci presenta una borsa del cirro. La lunghezza varia e può raggiungere 2-3 cm. per un diametro trasversale massimo di circa cm. 1,5. Le uova ovoidi, giallo-brunastre, operculate, sono molto grandi e misurano da 130 a 140 per 70 a 90 micromillimetri (fig 300). L'evoluzione è quella tipica, cui abbiamo accennato più sopra (pag. 1013).

Dicrocoelium lanceatum (Rud) (fig. 301).

Molto più piccolo del precedente misura da 4 a 9 mm. per una larghezza di 1.5 a 2.5 mm. Il suo corpo è appiattito, lanceolato, assottigliato alle due estremità, specialmente in avanti: è assai trasparente

e, senza alcuna preparazione, lascia veder bene gli organi interni. Le ventose sono rotondeggianti, l'anteriore è apicale e l'altra è ventrale ed un

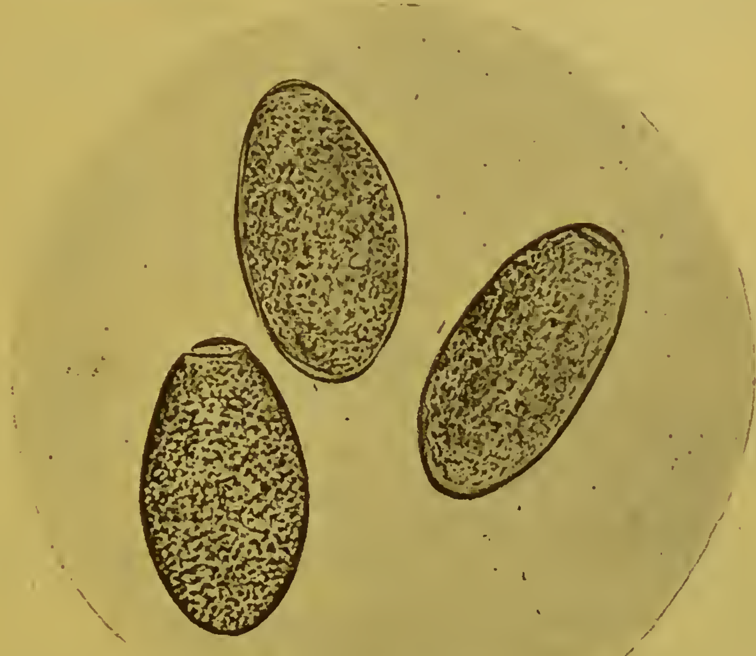


Fig. 300. — Uova di *Fasciola hepatica* (dal vero).

poco più grande di quella. L'intestino biforcato ha un esofago semplice e lungo. Le uova sono ovoidi, brune, con guscio spesso: misurano da 38 a 45 micromillimetri per 22-30 di larghezza. Gli embrioni, che si sviluppano da essi, sono ciliali solo nel loro terzo anteriore e subiscono una evoluzione simile a quella del *D. hepaticum*; solo l'ospite intermedio è un *Planorbis* (*P. marginatus*, *P. complanatus*).



Fig. 301. — *Opistorchis felineus*.

Clonorchis sinensis (Cobbold) (fig. 302).

Il corpo di questo parassita è oblungo, ristretto in avanti, arrotondato all'indietro; rossastro, quasi trasparente ed a cuticola liscia. La ventosa anteriore è più grande della posteriore, la quale è situata al quarto anteriore del corpo. La sua lunghezza è di 10 a 30 mm. per una larghezza di 4 mm. Le uova misurano 23-30 per 16-17 μ: sono quasi nere con il polo anteriore operculato, più ristretto del posteriore che ci presenta un piccolo prolungamento. L'operculo è assai distinto. L'evoluzione è ancora sconosciuta.



Fig. 302. — *Clonorchis sinensis*.

Opistorchis felineus (Rivolta) (fig. 303).

Ha il corpo depresso, lanceolato ed ovalare, fortemente attenuato in avanti ed ottuso allo indietro; cuticola liscia. È lungo da 7 a 12 mm. per una larghezza di mm. 2 a 2.5. L'uovo è ovoide, operculato, con una piccola punta al polo opposto all'operculo e misura 26 a 30 per 11 a 15 micromillimetri. Il suo ciclo evolutivo fu scoperto da Askanazy. Questi ritiene che due pesci di acqua dolce, il *Leuciscus rutilus* e l'*Idus melanotus* contengano i giovani Distomi incistati. I pesci poi si infesterebbero nutrendosi di un mollusco bivalve la *Dreyssena polymorpha* nel cui organismo si produrrebbe la evoluzione delle Cercarie.



Fig. 303. — *Opistorchis felineus.*

Opistorchis noverca (M. Braun, 1903).

Il corpo è rivestito di piccole spine. La forma è lanceolata, attenuata alle due estremità, ma un po' ottusa posteriormente. La ventosa posteriore è più piccola della anteriore, alla quale è molto ravvicinata. Misura da 9 a 12 mm. per una larghezza di 2-5 mm. L'uovo misura 34 × 19 micromillimetri, è ovoide ed operculato. L'evoluzione è sconosciuta.

Metorchis truncatus (Rudolphi, 1819).

È un verme lungo 2 millimetri, cilindro-conico: l'estremo anteriore è assottigliato; il posteriore è tronco e circondato da un anello muscoloso che può esser preso per una terza ventosa. Ha la superficie del corpo rivestita, tanto nei giovani, come negli adulti, di fini aculei ravvicinati fra di loro. La ventosa posteriore, situata poco avanti la metà del corpo, è di poco più grande della anteriore. L'uovo, lungo 29 micromillimetri per una larghezza di 11, è ovoide ed operculato. L'evoluzione è sconosciuta.

Fasciolopsis Buski (Lank, 1857).

È una specie molto grande, giacchè misura da cm. 3.5 a 7.5 su circa 2 centimetri di larghezza. Il suo spessore è considerevole, tanto che Busk, che per primo raccolse questo Distoma, lo chiamò *D. crassum*. Il suo corpo è ottuso alle due estremità, un po' più ristretto in avanti. La ventosa posteriore è più grande della anteriore, alla quale è molto vicina. Ha un colorito grigiastro con le parti laterali oscure per il pigmento che presentano le glandole vitellogene. Non se ne conoscono che esemplari, evacuati da uomini che dimoravano in Cina, ed ignoto è il ciclo evolutivo. L'uovo misura micromillimetri 125 per 75, è molto oscuro ed operculato.

Heterophyes heterophyes (von Siebold, 1852).

Il corpo di questo parassita è oblungo, rossastro, fortemente ristretto allo innanzi ed arrotondato posteriormente; depresso, leggermente convesso alla faccia superiore e pianeggiante nella inferiore. I tegumenti sono ricoperti da fine spinuzze solo nella metà anteriore. La ventosa anteriore è subterminale, piccola: la posteriore è circa 3 volte più grande di quella e disposta quasi nel centro. Il seno genitale, situato dietro alla ventosa ventrale, è circondato da un cercine circolare robusto, che gli dà l'aspetto di una terza ventosa. È lungo circa 1 mm. per 0.7 mm. di larghezza. Le uova

operculate, bruno rossastre, a guscio spesso, misurano 26 per 15 micromillimetri.

Sembra assai comune in Egitto, sopratutto negli indigeni. Trovato nel 1851 al Cairo dal Bilharz fu poi rinvenuto in seguito da Walter Inès, dal Keatinge e sopratutto dal Looss. Occupa il terzo medio dell'intestino tenue e all'autopsia può passare inosservato assai facilmente, data la sua piccolezza.

È comune nei cani e gatti, nella volpe ed anche in un uccello: il *Milvus parasiticus*. Evoluzione sconosciuta.

Paragonimus Westermanni (Kerbert, 1878) (fig. 304).

Ha una forma ovoide simile ad un chicco di caffè. La faccia ventrale è pianeggiante e la dorsale convessa. È lungo 8-12 mm., largo 4-6 mm., con uno spessore di 3-4 mm. Il suo colorito è rosso-bruno. La ventosa anteriore è subterminale, grande quasi quanto la ventrale. Faringe assai piccolo: esofago cortissimo e le due branche dell'intestino lunghe flessuose. La cute è coperta da larghe spine simili a scaglie. Il poro genitale non si trova sulla linea mediana e si apre presso il bordo posteriore della ventosa ventrale. Le uova operculate sono ovoidi, hanno un colore rosso-bruno e misurano 85-102 μ di lunghezza per una larghezza di 50-70 μ. Evoluzione sconosciuta.



Fig. 304. — *Paragonimus Westermanni.*

Vive abitualmente nella tigre, nel gatto, nel cane e nel maiale. È assai frequente anche nell'uomo sia nell'Asia come nell'America del Nord. Determina quella forma di distomatosi polmonare che va col nome di *emottisi parassitaria*. I polmoni presentano per lo più alla superficie e ai bordi delle cisti che contengono in genere due parassiti, nuotanti in mezzo ad un liquido purulento, ricco di uova. Le cisti possono essere numerose e confluire formando delle cavità più o meno estese. Spesso, per lo sviluppo del parassita, si hanno rotture di vasi e conseguenti emorragie alle volte insignificanti, alle volte così gravi da determinare la morte.

La diagnosi si fa dall'esame dell'espettorato che è di un colorito rosso-ruggine dovuto alla presenza in esso sia di sangue sia anche di numerose uova di color rosso-bruno.

Oltre che nei polmoni questo parassita fu rinvenuto nei muscoli, nel tessuto grassoso, nel peritoneo, nella pleura, nel fegato, nell'intestino, nel testicolo e assai spesso anche nel cervello.

Anche qui la sua presenza determina delle lesioni gravi accompagnate da una sintomatologia simile a quella della epilessia jacksoniana: l'esito è per lo più fatale.

La profilassi non può precisarsi essendo ignoto il ciclo evolutivo. In ogni modo è bene impedire che si sputi per terra ed occorre distruggere le uova che si trovano negli espettorati.

Fam. Schistosomidae.

I Trematodi appartenenti a questa famiglia sono a sessi separati con le ventose, boccale e ventrale, assai vicine. La femmina è filiforme: il maschio ha il corpo che dietro la ventosa ventrale si slarga e si appiattisce, ma i bordi restano costantemente ripiegati su loro stessi in modo da formare una doccia o canale ginecoforo che accoglie la femmina.

Le aperture genitali maschile e femminile si trovano ventralmente sulla linea mediana dietro la ventosa ventrale.

Schistosomum haematobium (Bilharz, 1852), *Bilharzia haematobia* Cobbold. (fig. 305).

Il maschio è lungo 11-14 millimetri e largo un millimetro circa; è biancastro. L'estremità anteriore è appiattita: le due ventose sono assai ravvi-

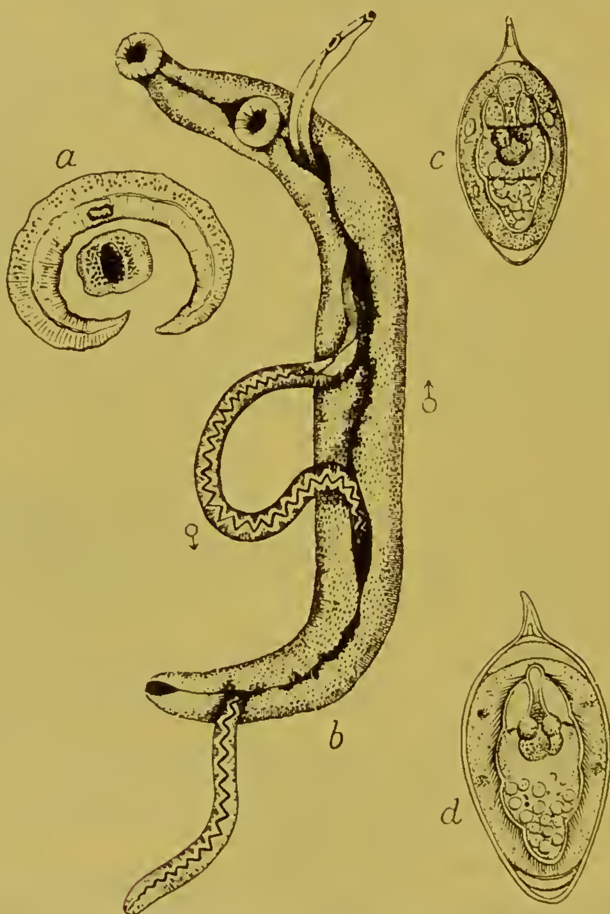


Fig. 305. — *Schistosomum haematobium*: *a*, sezione trasversale per mostrare il canale ginecoforo che contiene la femmina; *b*, Maschio e femmina accoppiati; *c*, uovo; *d*, uovo embrionato.

cinate; la boccale è imbutiforme col labbro più lungo di sopra che di sotto; la ventrale è peduncolata. La cuticola è ricoperta dorsalmente da piccole papille numerosissime e assai vicine fra loro; ventralmente, eccetto sulla linea mediana, presenta delle piccole spine.

La femmina è filiforme, quasi cilindrica, più lunga del maschio e di colorito più oscuro. Essa misura 15-20 mm. di lunghezza con una larghezza che va aumentando posteriormente ove raggiunge un massimo di 280 μ. Esiste un solco longitudinale mediano nella faccia ventrale.

Questo verme vive nella vena porta e nelle radici di essa e si spinge fino alle vene vescicali, uterine ed emorroidarie.

I due individui sono accoppiati ventre a ventre e gli orifici genitali si corrispondono di guisa che le femmine, più lunghe dei maschi, sporgono dal canale ginecoforo con le due estremità.

La femmina fecondata abbandona il maschio e si spinge fino ai vasi di piccolo calibro ove comincia la deposizione delle uova.

Queste sono ovalari, prive di operculo, e misurano 135-160 μ di lunghezza per una larghezza massima di 45-65 μ. Hanno ad uno dei poli un piccolo prolungamento spinoso lungo 30 μ. Le uova, espulse dalla femmina che per sè stessa è innocua, sono causa di una malattia assai grave, la *bilarziosi*, che, secondo la sede, prende il nome di *bilarziosi vescicale* (ematuria d'Egitto, cistite verminosa, ecc.), di *bilarziosi intestinale* (dissenteria da Bilarzia) e *bilarziosi genitale*.

Infatti la femmina fecondata si insinua fino nelle vene della sottomucosa tanto della vescica quanto del retto, qui depone le uova, le quali, parte per la *vis a tergo*, parte per i movimenti e contrazioni dell'organo, vengono spinte sempre più innanzi irritando col loro passaggio i tessuti fino a che giungono nella mucosa, la quale per il loro accumulo si rompe. Le uova cadute nel lume intestinale, vescicale o genitale vengono all'esterno con le urine, con le feci o col muco vaginale.

L'uovo espulso contiene già nel suo interno un embrione ciliato, che, immobile fino a che si trova nelle orine o nelle feci, diviene mobilissimo quando giunge nelle acque ove, rotto il guscio ed uscito, nuota liberamente.

È sconosciuto l'ospite intermedio, nè concordi sono le opinioni sul modo con cui giunge nell'organismo umano. Infatti mentre alcuni suppongono che vi giunga con le acque insieme ad un probabile ospite intermedio, altri credono che si arrivi direttamente per la pelle (Looss) ed altri ancora per le vie naturali durante i bagni. Sicchè, non conoscendosi bene l'evoluzione completa del parassita, nulla di preciso può dirsi circa la profilassi, che dovrà attenersi a misure d'indole generali; evitare cioè di mangiare erbe crude e di bere acque non filtrate ed anche di insudiciarsi la pelle con acque melmose.

Schistosomum japonicum (Katsurada, 1904).

È più piccolo del precedente: la cuticola dorsalmente è liscia mentre che tanto le ventose nei due sessi, quanto la faccia ventrale del maschio sono ricoperte di piccole spine assai refrangenti. Il maschio misura 9-12 mm. di lunghezza e mm. 0.5 di larghezza. La femmina è lunga 12 mm. con un diametro di mm. 0.4. Le uova sono giallo-brune, ovali, a guscio spesso, prive di operculo o di prolungamento spinoso: il loro contenuto quando son deposte dalle femmine è granuloso: misurano 60-80 μ per 30-50 μ, quando invece si rinvengono nelle feci sono un po' più grandi e possono contenere un Miracidio già formato.

Il parassita vive nel sistema venoso ed arterioso dell'uomo e del gatto, in Cina ed in Giappone; le uova deposte dalla femmina e trasportate nel tor-

rente circolatorio, possono riscontrarsi in vari organi e tessuti, ma di preferenza si rinvengono nel fegato, nell'intestino e nel peritoneo ove producono delle alterazioni assai gravi, tanto che la massima parte dei casi sono letali. La malattia che prende il nome di *bilarziosi arterio-venosa*, *bilarziosi sino-giapponese* od anche *malattia di Katayama* (provincia di Bingo nel Giappone) è caratterizzata dall'ipertrofia del fegato e della milza accompagnata da ascite. I malati hanno diarrea sanguinolenta, dolori addominali, tenesmo e assai sollecitamente sopraviene la cachessia ed il marasmo che non tardano a condurre a morte l'infermo.

La diagnosi si basa dall'esame microscopico delle feci ove si possono rinvenire le uova che, se non hanno sviluppato l'embrione, possono ad un esame superficiale essere confuse con quelle d'anchilostoma. Niuna norma profilattica può suggerirsi essendo sconosciuta completamente l'evoluzione del parassita. In ogni modo è bene seguire le stesse norme consigliate per lo *Schistosomum haematobium* con l'aggiunta di tener lontani i gatti, i quali, potendo come l'uomo albergare i parassiti, possono farsi agenti disseminatori della malattia.

NEMATELMINTI.

In questa classe debbono considerarsi tutti quei vermi non anellati, privi di appendici, che ci presentano il corpo cilindrico rivestito di uno strato di chitina continuo e mancanti di catena nervosa ventrale.

A seconda della presenza o no del tubo digerente vengono divisi nei tre ordini seguenti:

Tubo digerente	completo in tutte le fasi della vita	*Nematodi*
	atrofizzato negli adulti	*Gordii*
	assente - estremità anteriore con tromba retrattile munita di uncini	*Acantocefali*

1° Ord. **Nematodi.**

Sono vermi cilindrici (νῆμα, filo, εἶδος, forma) spesso assai lunghi e sottili, assottigliati alle due estremità, senza traccia di segmentazioni. Variabilissimi per grandezza; alle volte assai piccoli (*Trichine*, *Rhabdonema*, ecc.), altre molto grandi (*Filaria medinensis*, *Eustrongylus gigas*). Solo in qualche specie la porzione cefalica si differenzia dal resto del corpo sia per essere un po' più grande e rigonfiata (*Oesophagostoma*), sia per essere munita di speciale armatura boccale (*Ankylostoma*), sia per essere più sottile (*Trichocephalus*). Assai spesso però il corpo è uniforme e difficile è riconoscere le varie parti di esso.

Osservando attentamente un Nematode si vede subito che esso è rivestito di una *cuticola* di natura chitinosa striata trasversalmente, la quale qualche volta ci può presentare degli ispessimenti, sotto forma di scaglie o tubercoli, di spine, di espansioni sottili e trasparenti come ali membranose.

Sotto la cuticola esiste uno strato granuloso (*ipoderma, matrice della cuticola*) con dei nuclei sparsi; il quale si ispessisce secondo quattro linee longitudinali. Questi ispessimenti dell'ipoderma prendono il nome di *campi laterali* e *campi mediani* (dorsale e ventrale) e dividono più o meno distintamente il corpo in quattro loggie, che sono occupate dalle *cellule muscolari*. Queste si dispongono in vario modo e, secondo il diverso aggruppamento o la varia forma di esse, si venne a fare una divisione ben distinta dei Nematodi. In alcuni (*Polimiari*) esse sono numerose e tanto la parte vescicolare quanto il loro prolungamento si spingono nella cavità del corpo (Ascaris, Filaria, ecc.) in altri (*Meromiari*) sono assai scarse di numero (due o tre per ogni campo muscolare) e sono grandi e piatte (Oxyurus) in altri poi (*Olomiari*) sono numerosissime, piccole, assai ravvicinate l'un l'altra in modo da formare come uno strato uniforme e rendere invisibili i campi laterali e mediani (fig. 306).

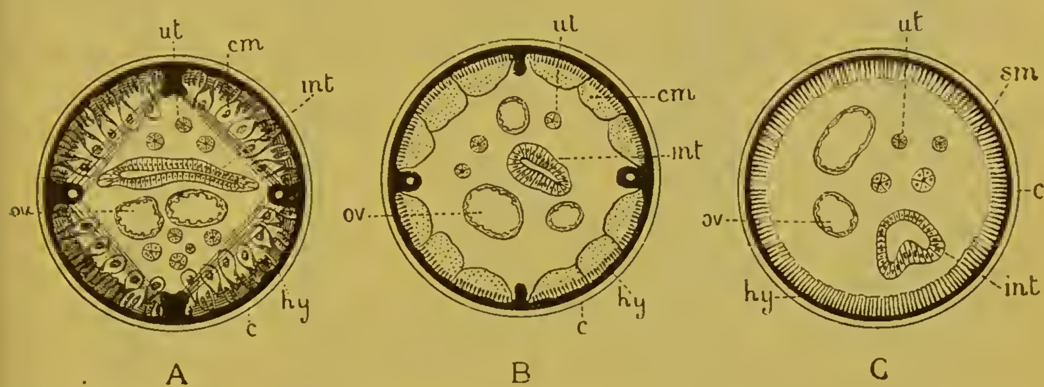


Fig. 306. — Sezioni trasversali di Nematodi. *A*, Polimiari; *B*, Meromiari; *C*, Olomiari: *c*, cutricola; *hy*, ipoderma; *cm*, *sm*, cellule muscolari; *int*, intestino; *ov*, ovaia; *ut*, utero.

L'apparato digerente nei Nematodi è completo e corre in linea diritta da un'estremità all'altra del corpo. La bocca è terminale e può essere provvista di labbra, armata di denti, di papille oppure essere completamente inerme. L'esofago muscoloso, vario di forma, a clava, cilindrico, moniliforme, lungo, breve, può esser semplice oppure seguito immediatamente o a distanza da una dilatazione (bulbo) la quale può anche essere internamente munita di denti (fig. 307).

L'intestino, che si continua con l'esofago, ha pareti assai sottili e mentre nella femmina termina direttamente con l'*ano*, nei maschi, prima di sboccare all'esterno, si fonde con il condotto genitale formando così una *cloaca*.

I sessi sono separati e spesso vi è dimorfismo sessuale. L'apparato genitale maschile è costituito da un lungo tubo più o meno ripiegato su sè stesso, diviso in più porzioni che si differenziano anche per la struttura e che prendono il nome di *testicolo, deferente, vescicola seminale* e *canale eiaculatore*. Questo è muscoloso e può lanciare lo sperma con una certa forza al momento dell'accoppiamento. Esistono anche organi copulatori rappresentati per lo più da spicoli chitinosi che possono estroflettersi ed immettersi nella vagina. Spesso sono in numero di due uguali o disuguali, ma non mancano esempi in cui lo spicolo è unico.

L'apparato genitale femminile è formato da due lunghi tubi più e più volte ravvolti su loro stessi, che finiscono poi per riunirsi in un tubo unico

la *vagina*, la quale sbocca in una *apertura vulvare* situata per lo più alla metà circa del corpo, ma che si può riscontrare o in vicinanza della bocca od anche vicino all'ano.

Come nel maschio così nella femmina le varie porzioni dell'apparato genitale sia per la struttura sia per la funzione assumono nomi diversi.

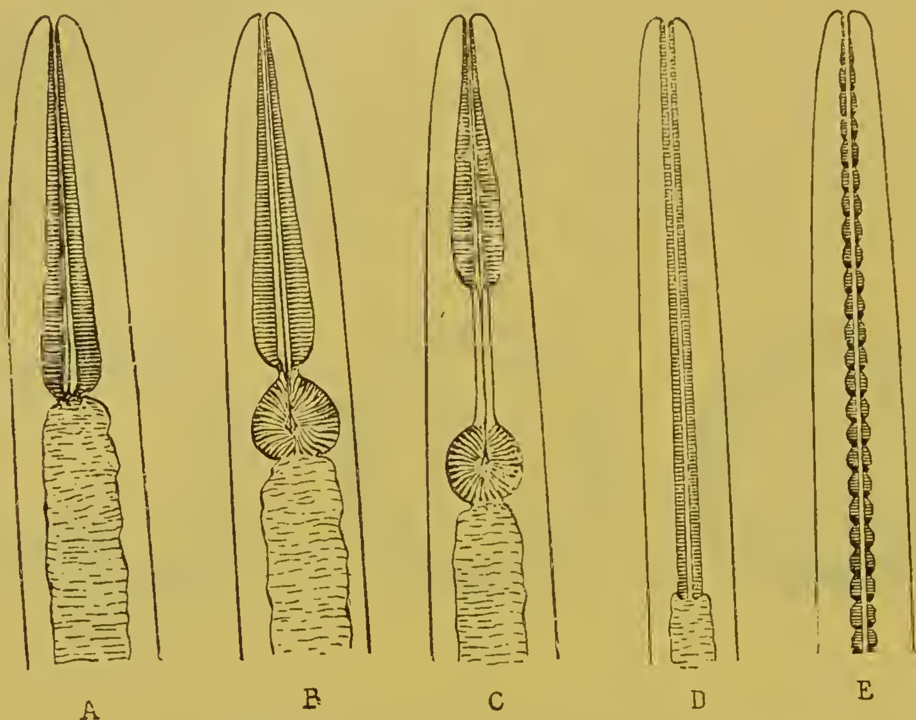


Fig. 307. — Varie forme di esofago nei Nematodi. *A*, claviforme; *B*, claviforme seguito immediatamente da un bulbo; *C*, seguito a distanza da un bulbo; *D*, cilindrico; *E*, moniliforme.

La porzione iniziale del tubo prende il nome di *ovaio*. A questo seguono un *ovidutto*, un *ricettacolo seminale* e poi un *utero* che sbocca nella vagina.

La fecondazione avviene per accoppiamento che può essere temporaneo o permanente (Syngamus) e la femmina fecondata può essere ovipara (Ascaride, Tricocefalo, ecc.), oppure vivipara (Trichine, ecc.).

Le uova delle varie specie sono assai diverse fra di loro per grandezza e per forma e per la struttura del guscio e sono così caratteristiche che spesso un solo uovo permette di fare la diagnosi del parassita.

Dall'uovo si sviluppa un embrione il quale si comporta assai diversamente.

Alcune volte (ciò che avviene per lo più nelle specie che depongono uova a guscio spesso e resistente) l'embrione, sviluppatosi nell'interno dell'uovo, non può esser messo in libertà che quando un ospite adatto lo ingerisca (sviluppo diretto), altre volte invece l'embrione rompe attivamente il guscio e segue la sua evoluzione nell'ambiente esterno. Allora subisce delle mute, si trasforma in larva e sotto questa forma giunge nell'ospite ove diviene adulto. Altre volte invece per giungere allo stato adulto è necessario l'intervento di un ospite intermedio, oppure occorre che una fase di vita si compia in un organo e l'altra in uno diverso. Da ciò ne segue che i Nema-

todi, per il loro svariato modo di sviluppo, possono dividersi nelle seguenti categorie:

1° Nematodi che passano tutta la loro vita parassiti nel medesimo viscere di uno stesso individuo (*Ascaride, Ossiuride, Tricocefalo*). In questo caso le sole uova si rinvengono nell'ambiente esterno.

2° Nematodi che vivono parassiti allo stadio adulto, liberi allo stato larvale (*Anchilostoma, Necator, Strongylus*).

3° Nematodi che pur vivendo tutta la vita parassiti nello stesso ospite, si rinvengono adulti in un viscere e allo stato giovanile in un altro (*Trichina*),

4° Nematodi che passano lo stadio giovanile come parassiti in un ospite e lo stato adulto in un ospite diverso (*Filaria Bancrofti*).

5° Nematodi a generazioni alternanti (*eterogonici*). In questi si notano due fasi di vita, una sessuata che vive libera ed una asessuata la quale vive parassita (*Strongyloides stercoralis*).

I generi e le specie parassite dell'uomo, per i loro caratteri morfologici, possono raggrupparsi in otto famiglie distinte dai seguenti caratteri:

- Nematodi
  - monogonici - corpo
    - rivestito di spine . . . . *Gnathostomidae*
    - liscio - esofago
      - claviforme
        - seguito a distanza da un grosso bulbo . . . . . . *Anguillulidae*
        - seguito immediatamente da un grosso bulbo . . *Oxyuridae*
        - semplice
          - bocca con tre labbra - estremità caudale del ♂ ricurva. *Ascaridae*
          - bocca con papille o denti - terminazione caudale del ♂ a campana . . . *Strongylidae*
      - cilindrico
        - moniliforme . . . . *Trichotrachelidae*
        - tubuloso . . . . *Filaridae*
  - eterogonici . . . . *Angiostomidae*

Alle due prime famiglie non appartengono che Nematodi trovati assai raramente ed accidentalmente parassiti dell'uomo. Infatti nella famiglia *Gnatostomidae* troviamo un'unica specie lo *Gnatostoma siamense* (Levinsen) di cui è nota la sola femmina estratta da un ascesso della parete toracica di una giovane Siamese: nella famiglia *Anguillulidae* riscontriamo la *Rhabditis pellio* (Schneider) che normalmente vive nell'erba umida e che fu trovata nelle urine acide di una donna ammalata di pielonefrite e la *Rhabditis Niellyi* (Blanchard) trovata in Brest nell'interno di alcune papule in un giovane mozzo.

Fam. Oxyuridae.

Oxyurus vermicularis (Linneo) (fig. 308).

È un piccolo verme filiforme e bianco. La cuticola è spessa e nelle parti laterali del corpo forma due creste longitudinali prismatiche mentre che intorno alla testa si rigonfia in guisa che questa si mostra al microscopio come munita di due alette membranose trasparenti e striate trasversalmente. La bocca che si apre in mezzo a questo rigonfiamento cefalico è armata di tre piccole labbra. Il maschio è lungo 2-5 mm. ed ha la parte caudale ravvolta a spira, all'apice della quale si apre la cloaca dalla quale fuoriesce l'organo copulatore rappresentato da un solo spicolo. La femmina è lunga 9-12 mm., la coda è assai assottigliata ed ha forma di lesina; alla sua base, a due millimetri circa dall'estremità posteriore, si apre l'apertura anale, mentre che quella vulvare è situata innanzi al quarto anteriore del corpo.

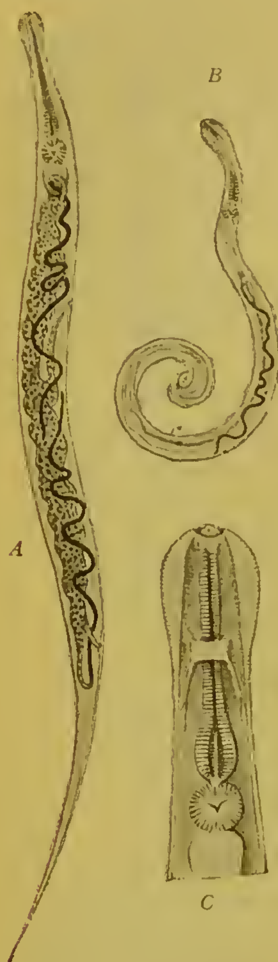


Fig. 308. — *Oxyurus vermicularis. A*, femmina; *B*, maschio *C*, estremità cefalica ingrandita.

Da giovane vive nell'intestino tenue: adulto scende nel cieco ove le femmine possono infossarsi nella parete dell'intestino, ma generalmente, una volta fecondate, scendono al retto ove si effettua il parto ed ove determinano delle irritazioni che si manifestano con dolori sordi e pruriti assai intensi. Ma oltre all'azione diretta che esercitano nel retto e nel bordo anale ed oltre a quella che possono esercitare negli organi genitali con la possibile emigrazione, esercitano un'azione riflessa nella sfera sessuale che si può manifestare con erezioni, polluzioni, onanismo e ninfomania. Le uova sono liscie, oblunghe, asimmetriche a forma di fagiuolo, hanno guscio spesso, misurano 50-34 μ per 16-25 μ e contengono già un embrione ben formato al momento del parto (fig. 309).

Si può calcolare che ogni femmina sia capace di contenere nel suo utero circa 12,000 uova. Queste difficilmente si rinvengono nelle feci, ma possono restare nell'ambiente esterno in uno stato di vita latente per parecchio tempo. Perchè possano continuare nel loro sviluppo è necessario un certo grado di umidità e una temperatura di non meno di 30°. L'azione prolungata dell'acqua, le uccide: quindi le uova embrionate, piuttosto che per il tramite delle acque sono normalmente trasportate nell'organismo umano o direttamente con gli erbaggi crudi o con il portare alla bocca le mani o gli oggetti contaminati. Ma oltre a ciò le uova, resistendo all'essiccamento, possono essere dal vento trasportate insieme alla polvere, depositarsi sulle frutta, sulle erbe o sugli oggetti che poi possono giungere a contatto della bocca. Sembra che anche le mosche possano agire come trasportatrici di uova sugli alimenti. Inoltre le stesse mani del malato, specialmente se bambino, possono essere tramite di infestione. In seguito infatti all'insopporta-

bile prurito anale che determinano i parassiti e che si esacerba la notte stando a letto, il malato può grattarsi e le unghie possono raccogliere le uova, che si trovano nel muco attorno all'ano, ed involontariamente possono essere portate alla bocca.

Gli Ossiuridi sono comuni in tutte le età ma la maggior percentuale è data dai bambini. Sono più frequenti nelle donne che non negli uomini, e assai spesso si riscontrano in più individui della stessa famiglia e là dove vi sono agglomerazioni di persone, dove cioè la vita in comune favorisce la propagazione del parassita (caserme, manicomî, ecc.). È un verme cosmo-

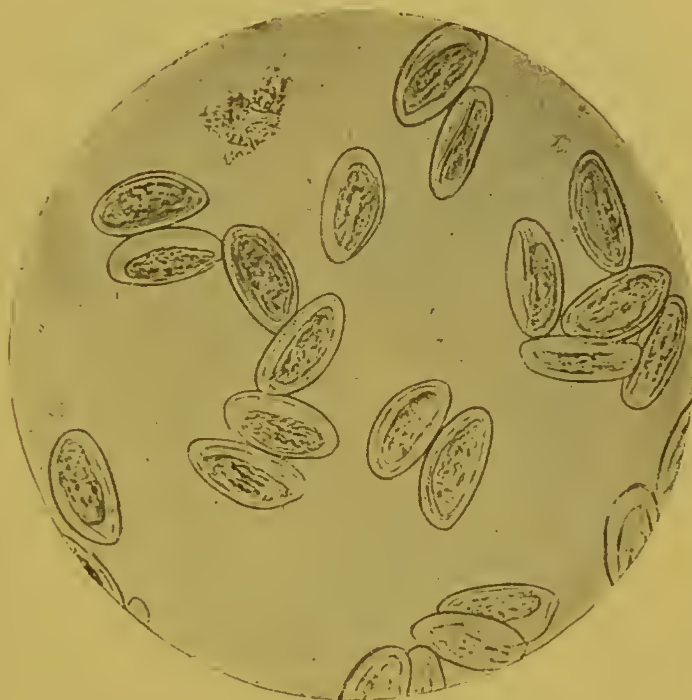


Fig. 309. — Uova di *Oxyurus vermicularis* (dal vero).

polita. La diagnosi dell'ossiuriosi, che è abbastanza facile sopratutto per il caratteristico prurito notturno, per l'instabilità ed il cambiamento di carattere del malato, si può convalidare con l'esame delle feci, nelle quali si rinverranno i parassiti od anche, cosa però non troppo frequente, le loro uova.

La profilassi consisterà:

1° nel proscrivere in modo assoluto la concimazione degli orti con le materie fecali umane;

2° nel sottoporre al bucato le biancherie che furono a contatto con individui infestati;

3° nell'astensione dal mangiare frutta od erbaggi crudi o mal lavati;

4° nell'evitare la convivenza di individui malati con i sani;

5° nell'esercitare una attiva sorveglianza, specialmente nei bambini, onde evitare l'autoinfestione, consecutiva al grattamento, e la possibile deglutizione delle uova.

Fam. Ascaridae.

Ascaris lumbricoides (Lin.) (fig. 310).

È forse il più comune dei vermi parassiti dell'intestino. Il corpo è di colorito bianco-gialliccio, attenuato alle due estremità e striato trasversalmente. La parte anteriore o cefalica è di poco più sottile della posteriore e la testa è munita di tre labbra, una dorsale che ci presenta alla base due papille e due latero-ventrali che si toccano nella linea mediana inferiore e che portano ciascuna una sola papilla.

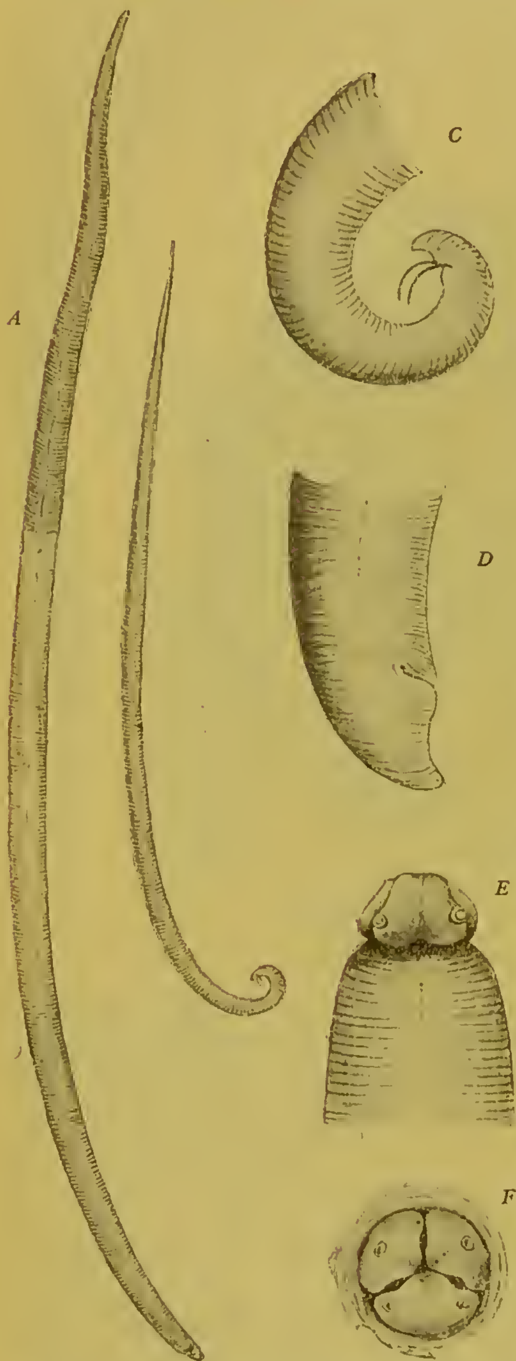


Fig. 310. — *Ascaris lumbricoides*. *A*, femmina; *B*, maschio; *C*, estremità caudale del maschio; *D*, estremità caudale della femmina; *E*, estremità anteriore veduta dal lato dorsale; *F*, bocca trilabiata.

Il maschio misura da 15 a 17 centimetri ed è facilmente riconoscibile per l'estremità posteriore ravvolta a spira. Dalla cloaca subterminale escono due spicoli corti un po' arcuati.

La femmina è lunga 20-25 centimetri: la sua estremità caudale è conica-diritta. L'ano è subterminale; la vulva è situata verso il terzo anteriore del corpo in uno spazio anulare liscio. Le uova elissoidi misurano 50-70 μ di lunghezza per 40-60 μ di larghezza; il loro guscio ha doppia parete, l'interna liscia e l'esterna gelatinosa, trasparente e così mammellonata da dare all'uovo un aspetto moriforme (fig. 311). Quando si osservano nelle feci sono di colorito giallo-bruno. L'evoluzione embrionale è lenta, avviene solo nell'ambiente esterno e, quando si tengono le uova nell'acqua o in un ambiente umido a conveniente temperatura, si compie in 30-40 giorni.

Se invece la temperatura è troppo alta (40°-42°) o troppo bassa (sotto i 12°) o si mantiene l'uovo in un ambiente secco, lo sviluppo viene ritardato di molto fino quasi a sospendersi. Una volta sviluppatosi, l'embrione non esce dall'uovo ma resta rinchiuso e vivo dentro di esso per lungo tempo se le condizioni d'ambiente sono favorevoli. Secondo Davaine, in questo stato la sua vita può prolungarsi per ben cinque anni.

L'infestazione nell'uomo è diretta e può avvenire per il tramite degli alimenti vegetali che possono contenere le

uova embrionate o forse, più facilmente, con il fango o per mezzo delle acque impure. Ciò spiegherebbe perchè gli Ascaridi sono così frequenti in coloro che lavorano la terra e negli abitanti delle campagne e relativamente rari in quelli che vivono nelle città, ove per lo più si fa uso di acque pure o filtrate. Si riscontrano indifferentemente in tutte le età, ma sono più frequenti nei ragazzi e nei giovani, sia perchè offrono un miglior ambiente di vita al parassita, sia perchè sono appunto essi che hanno l'abitudine di giuo-

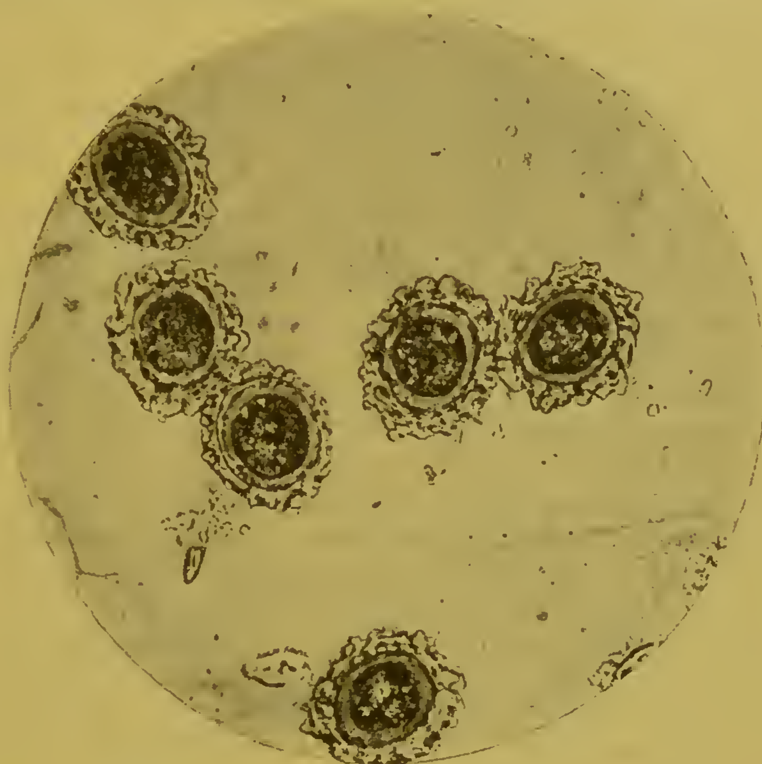


Fig. 311. — Uova di *Ascaris lumbricoides* (dal vero).

care con la terra. Le femmine ne vanno più soggette dei maschi. Raramente è solo: spesso anzi se ne rinvengono in un così considerevole numero da riempire un bel tratto dell'intestino.

Gli Ascaridi vivono normalmente nell'intestino tenue, ma in alcuni casi, per ragioni a noi ignote, abbandonano questa loro sede abituale ed emigrano. Qualche volta risalgono nello stomaco e nell'esofago, raggiungono il faringe e di qui per il laringe possono penetrare nei bronchi, nelle cavità nasali, nella tromba d'Eustacchio, determinando disturbi non lievi ed anche la morte per asfissia. Dall'intestino possono penetrare anche nel canale di Wirsung o più spesso nel coledoco, nella vescica biliare e nei canali biliari stessi che ostruiscono completamente.

Gli Ascaridi sono cosmopoliti. L'azione che essi esercitano nell'organismo umano è varia e mentre alcuni individui tollerano assai bene un discreto numero di essi nell'intestino, altri invece reagiscono assai violentemente.

È indiscutibile che la loro presenza eserciti un'azione meccanica, sia quando per il gran numero ostruiscono il lume intestinale, sia quando, anche in scarso

numero, vengono a formare gomitoli, sia quando per nutrirsi abradono con le labbra chitinose e armate di denticolatura la mucosa dell'intestino determinando anche un *locus minoris resistentiae* per la penetrazione di germi patogeni.

L'azione tossica invece fu molto discussa e mentre alcuni (Chanson, Cafiero, Mingazzini, Vaullegeard, Cattaneo) si mostrano favorevoli, altri (Cao, Allaria, Cosentino, Jammes e Mandoul, ed il Boycott) si mostrano contrari. Avendo fatto numerose esperienze in proposito Paolucci ed io (1) giungemmo alla conclusione, la quale del resto è in perfetto accordo con le osservazioni cliniche, che l'Ascaride può determinare una azione urticante sia sulla pelle come sulle mucose, ma solo in quegli individui che si mostrano suscettibili. In questi soli si manifesterebbero i fenomeni riflessi che qualche volta si riscontrano nell'ascaridiosi.

Data la varietà dei sintomi che accompagnano la presenza di Ascaridi nell'intestino, la diagnosi sicura si può fare solo con l'esame delle feci nelle quali si rinvengono le caratteristiche uova, spesso assai abbondanti.

Per la profilassi dovranno in parte seguirsi le norme consigliate per l'*Oxyurus*; ma, siccome gli embrioni di Ascaride contenuti nelle uova, vivono bene e si possono trasmettere per le acque, è necessario che, ove queste non presentano le dovute garanzie di purezza, vengano filtrate.

Ascaris canis (Werner) *A. mystax* Rud.

È un piccolo Ascaride assai comune nei cani e nei gatti. Fu riscontrato più volte anche nell'uomo. Esso è biancastro: ha l'estremità anteriore ricurva e provvista lateralmente di due espansioni cuticolari aliformi, le quali dànno all'estremità cefalica l'aspetto di una lancia. La bocca è trilabiata e le labbra hanno i bordi denticolati. Il maschio è lungo da 5 a 10 centimetri ed ha l'estremità caudale ravvolta a spira e munita di due alette membranose e di numerose papille laterali. La femmina è lunga da 9 a 16 centimetri; la sua coda è ottusa; l'ano è subterminale e la vulva è situata verso il quarto anteriore del corpo. Le uova sono quasi globose a guscio spesso con la superficie scabrosa, quasi alveolata.

Si comporta come l'*Ascaris lumbricoides*; però, malgrado le ripetute esperienze nei cani stessi, non si è riusciti ad ottenere l'infestazione sperimentale con le uova embrionate.

Fam. **Strongylidae.**

Questa famiglia comprende parecchi ed importanti parassiti dell'uomo ed è caratterizzata dall'avere la bocca munita di denti, di lamine chitinose o di papille e dal presentarci i maschi all'estremità posteriore una espansione cuticolare, campanuliforme e sorretta da ispessimenti muscolosi (*costole*), che costituisce la *borsa copulatrice*. In mezzo ad essa si apre la cloaca, da cui esce l'organo copulatore rappresentato da uno o due spicoli.

Si divide nelle seguenti sottofamiglie distinte sopratutto per la forma della bocca.

(1) Alessandrini e Paolucci. *Sulla tossicità degli Ascaridi.* Annali d'igiene sperimentale.

Bocca	senza capsula chitinosa	con 6 grosse papille - borsa caudale del ♂ ovalare, priva di costole - uno spicolo.	*Eustrongylinae*
		con piccole papille - borsa caudale del ♂ lobata e sorretta da costole - due spicoli uguali	*Strongylinae*
		con due labbra munite di papille e denti - borsa caudale del ♂ vescicolosa che avvolge la coda intera - due spicoli ineguali.	*Physalopterinae*
	con capsula chitinosa - borsa caudale del ♂ lobata sorretta da più costole - due spicoli uguali . . .		*Sclerostominae*

La sottofamiglia *Eustrongylinae* comprende un solo genere rinvenuto parassita dell'uomo.

L'*Eustrongylus visceralis* (Gmelin) (*E. gigas* Diesing) (fig. 312).

Questo, fra i Nematodi, è senza dubbio il più grande. Ha il corpo cilindrico, assottigliato alle estremità, di color grigio-rossastro, rosso-sanguigno od anche biancastro. La femmina è più lunga del maschio, potendo giungere fino alla lunghezza di un metro con una larghezza massima di mm. 12, mentre il maschio dai 14 può giungere fino ai 40 centimetri con un diametro di mm. 4-6. La borsa copulatrice maschile è costituita da una espansione campanuliforme, ovalare, a diametro trasversale maggiore; il bordo di essa è guarnito da piccole papille ed è leggermente sinuoso alla faccia dorsale e ventrale. Dal mezzo della borsa fuoriesce uno spicolo setiforme lungo 5-6 millimetri. L'estremità caudale della femmina è ottusa e la vulva è situata in prossimità della bocca. Le uova elissoidi, brunastre, hanno guscio spesso e tutto crivellato di depressioni più o meno profonde; misurano da 64 a 68 μ di lunghezza per 40-44 di larghezza. I due poli sono lisci ed incolori.

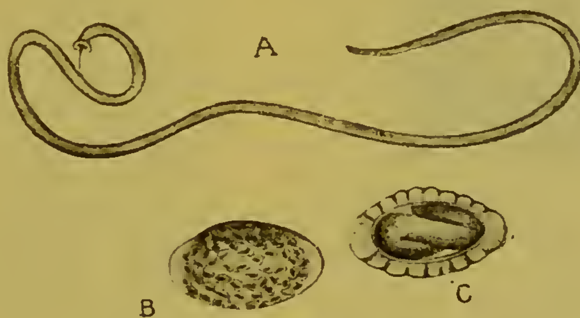


Fig. 312. — *Eustrongylus visceralis.*
A, maschio; *B*, uovo; *C*, uovo embrionato.

L'uovo si sviluppa in un ambiente umido e l'embrione che in esso si forma può vivere assai a lungo, fino a cinque anni, senza uscire dal guscio. Inutilmente si cercò di infestare i cani facendo loro ingoiare le uova embrio-

nate: ciò fa supporre che sia necessario un ospite intermedio e si emise la ipotesi che questo possa essere un pesce.

L'*Eustrongylus visceralis* è parassita abbastanza comune nei cani da caccia; ma fu osservato anche nel lupo, nella lontra, martora, foca, cavallo, bue ed anche nell'uomo, nel quale se ne contano ben dieci osservazioni. Si localizza nel bacinetto renale e col suo accrescersi il parenchima viene distrutto completamente, restando solo la capsula renale che racchiude il parassita. Spesso si incunea nell'uretere determinando delle sofferenze e delle lesioni assai gravi (fig. 313).

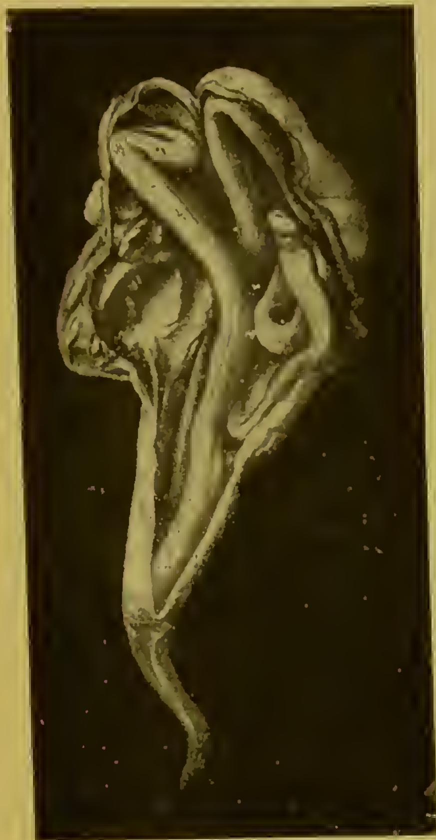


Fig. 313. — *Eustrongylus visceralis* in rene di cane (dal vero).

La diagnosi si può fare con l'esame delle urine che sono in generale sanguinolente o purulente e che presentano le uova del parassita.

Nessuna misura profilattica speciale può consigliarsi essendo sconosciuta l'evoluzione.

Nella sottofamiglia *Strongylinae* che comprende un gran numero di specie parassite degli animali, si debbono considerare come parassite dell'uomo cinque sole specie appartenenti ai due generi *Metastrongylus*, *Trichostrongylus*, e *Strongylus* ma, data la scarsezza delle osservazioni, credo opportuno dare solo delle indicazioni sommarie.

Metastrongylus apri (Gmelin) (*Strongilus paradoxus* Mehlis.) comune nei polmoni del maiale e cinghiale nei quali determina una bronchite verminosa spesso mortale. Si riscontra abbastanza frequente nei maiali uccisi al Mattatoio di Roma. Fu trovato due volte soltanto nell'uomo: una prima volta nel polmone d'un ragazzo ed una seconda nell'intestino di un vecchio venditore di carne di maiale.

Trichostrongylus instabilis (Railliet). Si rinviene spesso in gran numero nello stomaco ed intestino delle pecore e capre nelle quali determina una anemia perniciosa. Nell'uomo fu rinvenuto dal Looss in Egitto e da Ogata e Ijima nel Giappone.

Trichostrongylus probolurus (Railliet) e *Trichostrongylus vitrinus* (Looss), comuni nel duodeno del montone, furono trovati nell'uomo dal Looss nei *fellhas* d'Egitto.

Strongylus contortus Rud., vive normalmente nel quaglio e qualche volta nel duodeno degli ovini. È comune in quelli della campagna romana. Si attacca alla mucosa per succhiare il sangue, provocando, se in numero grande, una anemia perniciosa, tanto più grave quanto più giovani sono gli animali colpiti. Secondo il prof. de Magalhâes questa specie, rinvenuta da lui per la prima volta al Brasile nell'uomo, sarebbe in questi capace di determinare una grave anemia, simile a quella prodotta dall'Anchilostoma.

La sottofamiglia delle *Physalopterinae* comprende, come parassita dell'uomo, la *Physaloptera caucasica* von Linstow, trovata una sol volta nell' intestino di un abitante del Caucaso.

La sottofamiglia *Sclerostominae*, che comprende molti generi e molte specie parassite degli animali domestici, non ne ha che cinque dell' uomo. Due *Oesophagostomum* (*Oe. Brumpti* Railliet ed Henry, *Oe. stephanostomum* var. *Thomasi* Railliet ed Henry), un *Ternidens* (*T. deminutus* Railliet ed Henry), un *Ankylostomum* (*A. duodenale* Dubini), ed un *Necator* (*N. americanus* Stiles).

Lascio da parte i primi tre, de' quali esistono osservazioni isolate, per occuparmi un po' più diffusamente degli altri due assai comuni.

Ankylostomum duodenale Dubini 1838.

È un verme bianco-roseo, cilindrico, più assottigliato anteriormente. Ha la estremità anteriore ricurva verso la faccia dorsale; la bocca ovalare; tagliata obliquamente è limitata da una cuticola trasparente e seguita da una capsula buccale chitinosa, di cui la parete dorsale è più corta della ventrale.

La capsula buccale è armata nella sua parte ventrale di quattro denti chitinosi, robusti, a forma di uncino colla punta rivolta all'interno della

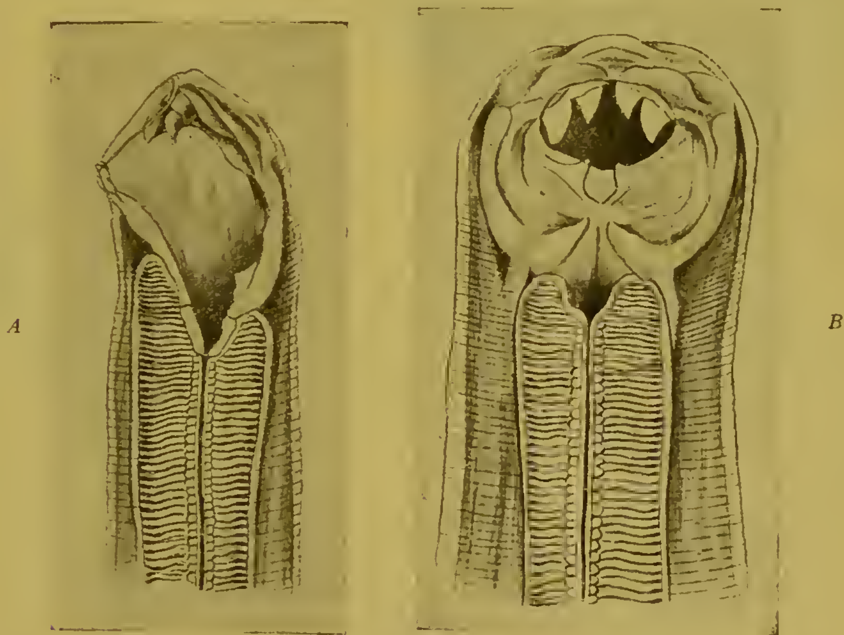


Fig. 314. — *Ankylostomum duodenalis*. Estremità anteriore: *A*, di profilo; *B*, dal lato dorsale.

capsula stessa. Gli interni sono leggermente più piccoli degli esterni. Anche la faccia dorsale è armata di due piccole eminenze o punte chitinose, con la punta rivolta allo innanzi, le quali lasciano nel mezzo una fessura molto pronunciata. Al fondo poi della capsula esistono anche due lancette taglienti che furono chiamate *lamine faringee;* da esse si parte dorsalmente una specie di dente che è saldato alla capsula stessa e si spinge fin verso il margine boccale in mezzo alle due eminenze dorsali (fig. 314).

Il maschio è lungo 8-11 mm., largo 0.4-0.5 mm.: ha la borsa caudale (fig. 315) con quattro lobi, di cui il lobo dorsale è il più piccolo. Essa è sorretta da undici ispessimenti muscolosi o *costole* che presentano una disposizione speciale. La *dorsale*, o costa posteriore, verso l'estremità si biforca ed ogni biforcazione si presenta tridigitata, da ciascun lato di essa nasce una costola *dorso-laterale*, postero-esterna, o prima laterale che, pur non raggiungendo il bordo della borsa, termina ai lobi laterali presso al punto di unione di questi e del lobo dorsale. Altre tre costole *laterali* (2^a, 3^a e 4^a) partono da un tronco comune insieme alla costola *ventrale*, ma, mentre quelle divergendo occupano la massima parte del lobo laterale, si estende questa fino alla insenatura che divide questo lobo da quello ventrale e ci si presenta divisa nella massima parte della sua lunghezza. In mezzo alla borsa copulatrice, all'apice di una sporgenza conica, si apre la cloaca donde escono i due spiculi lunghi e sottili.

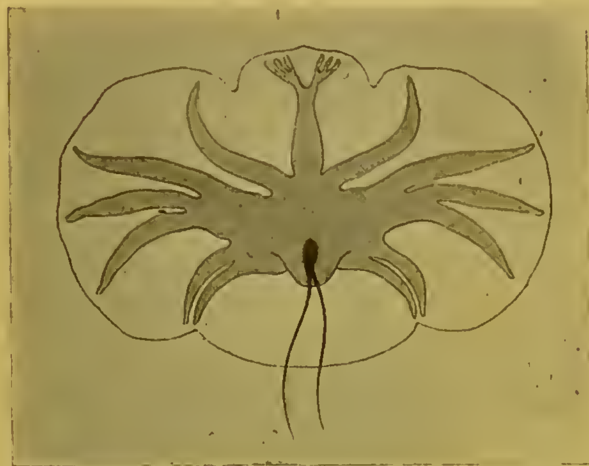


Fig. 315. — Borsa caudale del maschio di *Ankylostomum duodenale* (schematica).

La femmina, lunga 10-18 mm., ha la coda ottusa, conica, terminante con un leggero rigonfiamento della cuticola, dal mezzo del quale fuoriesce una piccola punta spinosa. La vulva si apre verso il terzo posteriore del corpo.

Nell'Anchilostoma, come in quasi tutti gli Strongilidi, ai lati della capsula boccale si aprono due *glandole cefaliche*, le quali debbono considerarsi come glandole salivari e segregano un liquido che impedisce al sangue di coagularsi.

Altre due poi grandi, liberamente nuotanti nella cavità del corpo (*le glandole cervicali*), occupano circa la metà della sua lunghezza (fig. 316) Sono unicellulari, a contenuto granuloso, con un grosso nucleo nella parte posteriore che è alquanto rigonfiata, e presentano anteriormente un canalino escretore che comunica con l'esterno per mezzo di un poro unico (*poro escretore*). Questo si trova situato nella faccia ventrale del parassita a breve distanza dall'apice anteriore di esso ed alquanto innanzi alle *papille laterali*.

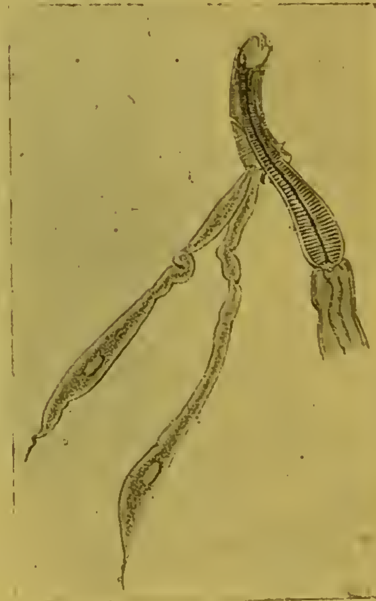


Fig. 316. — Glandole cervicali dell'*Ankylostomum*.

Ora, secondo i risultati delle mie esperienze (1), è a queste glandole

(1) G. ALESSANDRINI. *Sulla patogenesi dell'anemia da Ankylostoma*. Policlinico, vol. XI, 1904.

cervicali (e forse in parte anche alle cefaliche) che si deve la secrezione della sostanza tossica ad azione emolitica che determinerebbe l'anemia da Anchilostoma.

L'Anchilostoma vive nell'intestino tenue dell'uomo ed i maschi si rinvengono in un numero minore delle femmine (uno per ogni tre). L'accoppiamento dura piuttosto a lungo e, dal momento che la vulva è situata nel terzo posteriore del corpo, i due vermi uniti si dispongono a Y.

Il parto comincia nel giorno susseguente a quello in cui termina l'accoppiamento e ciascuna femmina depone un numero considerevole di uova che si rinvengono nelle feci ed hanno una figura assai caratteristica. Esse sono ovoidi a guscio assai sottile e trasparentissimo ed assai resistente, misurano 52-65 μ di lunghezza per una larghezza di 32-43 μ, e presentano al momento del parto, già formati, 2 o 4 blastomeri (fig. 317).


Fig 317. — Uova di Anchilostoma (dal vero).

Lo sviluppo si compie sul terreno, sia negli stessi escrementi, sia nella terra, a condizione che l'ambiente sia *umido, ben aereato* e *caldo* (+ 18° a 28°). Le uova muoiono a + 5° e l'evoluzione è oltremodo lenta a + 15°.

Lo sviluppo artificiale delle uova non è difficile ottenersi nei laboratori, purchè coltivate opportunamente ed a conveniente temperatura.

Furono dai vari sperimentatori adoperati molti mezzi di coltura.

Il Perroncito consiglia di mettere le materie fecali, contenenti le uova in un vaso a larga apertura, coperto da carta forata, e mantenuto alla temperatura di 25°-30°

Il Grassi e Parona ottengono facilmente lo sviluppo in vaso coperto, tanto conservando le feci pure, quanto aggiungendovi albume, commischiandovi terra o diluendole in acqua: ma il migliore resultato, cosa che ho potuto esperimentare io stesso più volte, lo hanno ottenuto tenendo delle feci in un tubetto ben tappato, tenuto nel taschino del panciotto.

Il Looss suggerisce di mescolare alle feci una quantità pressochè uguale di polvere di carbone animale, e inumidire la massa, ottenuta da questa miscela, con piccola quantità di acqua. Al quarto giorno, dopo averla tenuta in una stufa a 25°-30°, si lascia seccare poco a poco la pasta. Nelle fessure che si verranno a formare si accumulano tutte le larve.

Ho voluto provare tutti questi metodi e li ho riscontrati tutti buoni: ma ho sempre ricorso con successo ad un metodo mio speciale, che, avvicinandosi più degli altri all'ambiente naturale, mi ha dato sempre ottimi risultati. Esso consiste nel riempire una bacinella di porcellana (quelle da fotografia sono le migliori) di argilla, resa pastosa per aggiunta di acqua. Scavo nel centro di essa una cavità larga e poco profonda ove pongo le

feci, ed all'intorno, concentricamente a questa, ne pratico un'altra più stretta a guisa di fossato di cinta, il cui fondo però si trovi ad un livello più basso di quello della prima (fig. 318). In questa scanalatura esterna verso di quando in quando un poco di acqua, la quale, filtrando attraverso la creta, mi mantiene sufficientemente e costantemente inumidito il materiale di studio che si trova più all'interno e più alto. Lo sviluppo possibile di muffe o di protozoi che ostacolerebbero quello delle uova si impedisce facilmente coll'impastare l'argilla in acqua bollente e col mantenere l'umidità per mezzo dell'acqua distillata e bollita piuttosto che con quella di fonte.

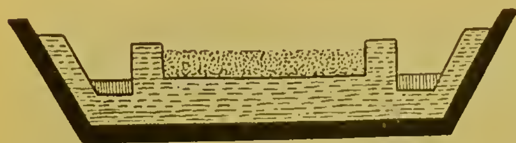


Fig. 318. — Bacinella per lo sviluppo delle uova di *Ankylostomum*.

Se la temperatura si mantiene costante fra i 25° e i 30° è facile seguire tutte le fasi di segmentazione dell'uovo.

Terminato il processo di segmentazione e raggiunto lo stato di morula, vediamo formarsi una depressione ad uno dei lati; dapprima leggerissima, essa diviene a poco a poco più profonda; la porzione superiore si ripiega a cappuccio e costituisce così l'abbozzo della coda, mentre l'altra porzione si assottiglia, si allunga e verrà a formare in seguito la porzione cefalica.

Già dopo qualche ora d'incubazione attraverso il guscio si vede che l'embrione più o meno abbozzato cresce con una rapidità straordinaria.



Fig. 319. — Uova di *Ankylostomum* in varie fasi di sviluppo.

L'uscita di esso dall'uovo si effettua quasi sempre per la testa e ad uno dei poli; ma non raramente mi è occorso di vederne uscire per la coda e dalle parti laterali del guscio (fig. 319).

Una volta che questo è abbandonato, l'embrione, reso libero, si allontana con movimenti anguilliformi rapidi e vivaci. Allora prende il nome di larva ed è lunga 200-210 μ, larga 14 circa: assottigliata posteriormente, ha una coda a forma di lesina. L'estremità anteriore, leggermente ottusa, termina con una bocca munita di tre papille: ad essa fa seguito un canale a margini paralleli, il quale sbocca in un faringe muscoloso a pareti spesse

e che occupa una quinta parte del corpo. Dopo essersi nuovamente ristretto, il faringe sbocca in un rigonfiamento sferico, provvisto nell'interno di tre denti chitinosi, che limitano uno spazio triangolare (*larva rabditoide*). L'intestino è in questo stadio tortuoso.

La larva rabditoide è assai attiva e si accresce rapidissimamente: al 3° giorno subisce una prima muta e raggiunge i 300 μ; verso il 7°-8° giorno misura già 560 μ di lunghezza per una larghezza di 24 μ. Allora il tubo digerente ha perduto la sua forma primitiva, diviene rettilineo, il faringe diviene cilindrico, il bulbo faringeo sparisce e si nota già un abbozzo degli



Fig. 320. — Larve d'*Ankylostomum* in varie fasi di sviluppo. *A*, larva rabditoide; *B*, *C*, larve strongiloidi incistate; *D*, larva in via dica lcificazione. (*C* e *D* dal Perroncito).

organi genitali (*larva strongiloide*) (fig. 320). Questa fase di sviluppo rappresenta lo stadio larvale perfetto.

In questo periodo, secondo il Perroncito, Leichtenstern e Trossat, avviene alla superficie di essa una secrezione abbondante di una sostanza chitinosa e jalina, la quale finisce per inviluppare tutta la larva e formare intorno ad essa una vera capsula che, a guisa di doppia membrana, ne segue tutti i movimenti.

Invece, secondo me, per quello che ho veduto e per quello che generalmente accade negli altri Nematodi, mi è sembrato più logico ammettere che la larva subisca una specie di coartazione nell'interno della sua cuticola, e che a spese di questa, per contribuzione del suo strato tegumentario

(*matrice della cuticola, hypoderma*), si venga a formare la nuova. Infatti la larva incapsulata è più piccola della larva giunta a termine di sviluppo e la cuticola di quella, mantenendo tutti i caratteri (dimensione, forma, striatura, traccie di campi laterali, papille boccali, fessura anale, ecc.), non è che una muta dalla quale questa non esce e di cui si serve come di una capsula protettiva per resistere meglio all'azione dei vari agenti esterni fisico-chimici. Perchè possa raggiungere questo grado di sviluppo sono necessari per le larve, come si disse per l'uovo, l'aria, il calore e l'umidità.

L'ossigeno è indispensabile alla loro vita: muoiono infatti negli ambienti dove l'aria fa difetto e nelle miniere dove vi è sviluppo di *grisou*. Il calore non deve essere nè esagerato nè scarso; l'azione diretta e prolungata del sole le uccide, e se il parassita si rinviene ne' climi caldi, ciò devesi sopratutto al fatto che restano in vita solo quelle larve che vivono al riparo dei raggi solari. Un certo grado di umidità è indispensabile, ed infatti le larve, che vivono assai bene ed a lungo anche nell'acqua, non possono svilupparsi che nel fango, giacchè, come si disse, le uova hanno bisogno, per compire la loro segmentazione, di un ambiente molle, nè troppo fluido, nè troppo denso. Ciò non toglie però che qualche volta le uova dell'*Ankylostoma duodenale*, come risulta da mie osservazioni personali, possono seguitare il loro sviluppo non solo in un ambiente perfettamente liquido, ma anche nell'interno del corpo della madre morta, espulsa dall'ospite e mantenuta in una soluzione tenue (la fisiologica) di cloruro sodico.

Il fatto che esse non si sviluppano nelle feci diarroiche è dovuto, secondo me, non alla fluidità di queste, ma solo alla scarsezza di ossigeno ed allo stato di putrefazione che può essere sopravvenuto.

Secondo le esperienze del Perroncito, le larve mature dell'Anchilostoma muoiono in 5 minuti alla temperatura di 50° C: una soluzione di potassa caustica al 5 % le distrugge in meno di ½ ora. Il cloruro di sodio ha anch'esso una azione nociva su di esse; infatti, se si tratta di larve di recente incapsulate od immature, muoiono in pochi minuti nella soluzione di Na Cl al 9-10 %; se mature, ma non calcificate, occorre quella del 12 %; se poi sono mature, con capsula calcificata, resistono 24'-25' alla soluzione del 15-16 %.

Muoiono subito nell'acido solforico e cloridrico: l'acido solforico commerciale diluito nella proporzione di 6 su 4 di acqua le uccide in 3' e la diluizione di 1 su 4 in 15'-16'.

L'acido fenico alla soluzione dell' 1 % le distrugge in 4'-7', al 3 % in 3' e al 5 % in pochi istanti.

Le esperienze del Previtera, fatte per distruggere le uova e larve dell' Anchilostoma, sopratutto con il cloruro di sodio, latte di calce, solfato ferroso, condussero alle seguenti conclusioni:

1. Con nessuna delle sostanze sperimentate si può sicuramente arrestare la maturazione delle uova di Anchilostoma duodenale.

2. Si può tuttavia impedirne lo schiudimento con la soluzione di cloruro di sodio al 5 %, con il latte di calce, e con la soluzione di solfato ferroso al 2 %.

3. Le larve giovani, non ancora incapsulate, vengono uccise in tempo più o meno breve, non oltre le 24 ore, dall'acqua salata al 3-4 %, dal latte di calce diluito, dall'anidride solforosa.

4. Le larve pienamente mature non muoiono prontamente, o al più in poche ore, nella soluzione satura o non inferiore al 20 % di cloruro sodico, nel latte di calce non diluito, nel solfato ferroso in soluzione satura e in un'atmosfera ricca di anidride solforosa.

5 Le stesse vengono tuttavia uccise in 3-4 giorni dal cloruro di sodio al 10 %, in 1-2 giorni dal solfato ferroso al 20 %.

Le larve giunte al massimo grado di sviluppo, sieno esse incapsulate o no, possono giungere ad infestare l'uomo.

Esse giungono nell'intestino:

1° *per la via boccale.*

Le ricerche del Parona, del Grassi e del Perroncito dimostrarono in modo inconfutabile che la via della bocca è quella che seguono le larve di *Ankylostomum* per infestare l'uomo. Ciò accade, sia per mezzo dei cibi, sia per mezzo delle acque inquinate, sia, più facilmente, portando le mani o gli strumenti sporchi sulle labbra. Tutte le osservazioni posteriori non hanno che confermato questo fatto.

2° *per la via cutanea.*

Il Looss (1), accidentalmente dapprima, poi con una serie di esperimenti, dimostrò che le larve possono anche giungere all'intestino penetrando attraverso alla pelle.

Le esperienze del Looss furono poi confermate dal Sandwith, Austregesilo, De Menezes, Schaudinn, da me e da molti altri sperimentatori.

Circa la via che le larve seguono per giungere nell'intestino il Looss stesso ed altri ritengono che esse, penetrando sotto la pelle, siano poi dai vasi sanguigni o dai linfatici portate nel cuore destro e da qui nei capillari polmonari. Non potendo però oltrepassarli per il loro diametro troppo esiguo perforerebbero la sottile parete alveolare e verrebbero a trovarsi nell'albero respiratorio. Risaliti i bronchi, la trachea, il laringe, scenderebbero dal faringe nell'esofago, nello stomaco e nell'intestino. Io, come già dissi in un altro mio lavoro, basandomi sopratutto sul fatto che cani e gatti non possono completamente infestarsi con l'Anchilostoma dell'uomo, quando le sue larve mature vengono date per la bocca, mentre si infestano se queste vengono inoculate sotto la pelle, ritengo che la lunga e tortuosa via supposta dal Looss non sia la normale, ma che ve ne debba essere un'altra più breve e più sicura.

Il passaggio delle larve attraverso la pelle produce una dermatosi caratterizzata da papule vescicolose, che, sotto nomi diversi secondo i differenti paesi, fu descritta da molto tempo dal Bozzolo, Perroncito, Stapff, Manouvriez, ecc., nei fornaciai, nei minatori, nei solfatari.

Comunque l'infestazione avvenga, per via boccale o per quella cutanea, essa è diretta e sempre per via umida giacchè le larve non resistono all'essiccamento.

Secondo però alcune mie osservazioni è probabile che alcuni insetti, spe-

(1) Looss A. *Ueber das Eindringen der Ankylostomalarven in die menschliche Haut.* Centralblatt für Bakteriologie, ecc., XXIX, pag. 733, 739 — 1911.

Id. *Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut.* Centralbl. f. Bakter., Paras., Abt. I., Bd. XXXIII, p. 330-343 — 1903.

Id. *Einige Bemerkungen zu Pieris « kurzer Erwiderung »*, *etc.* Centralbla für Bakteriologie, Parasit., Bd. XXXV, pag. 602-605 — 1904.

cialmente le mosche, possano trasportare meccanicamente sia sulla pelle dell'uomo, sia direttamente nella bocca di esso, specialmente durante il sonno all'aria aperta, larve di *Ankylostomum* vive ed in qualsiasi periodo di sviluppo. L'infestazione che ne deriva può essere più o meno grave a seconda del numero delle larve trasportate.

E molto probabilmente io ritengo che anche in questo modo avvenga l'espandersi del male intorno ad un primo punto d'infestazione e che questo e non la polvere sia uno dei mezzi per portare le uova e le larve in centri anche abbastanza lontani da quello di origine.

Una volta avvenuta l'infestazione dopo un certo periodo d'incubazione che è variabilissimo, generalmente da 5 a 6 settimane, si manifesta l'*anchilostomiasi* di cui il sintomo principale è una grave anemia, dovuta in parte ad una azione sottrattiva che esercita il parassita ed in parte all'azione tossica che è conseguenza dell'assorbimento della tossina emolitica segregata dalle glandole cervicali.

La storia dell'anchilostomiasi può riassumersi nel quadro seguente:

TABELLA 96.

Anno	Autori più importanti	Fatti più notevoli
1838	*Dubini*	Scoperta dell'Anchilostoma.
1847-54. . .	*Pruner, Bilharz, Griesinger*	L'Anchil. è la causa della clorosi d'Egitto.
1866	*Wucherer, Grenet e Monestier* . . .	Si scopre l'Anchil. a Bahia (Brasile) ed a Mayotte e si ritiene come causa della clorosi tropicale (*tun-tun*, cachessia acquosa, *opilaçao*).
1872	*De Moura*	Attribuisce all'Anchil. la *hypohemia* intertropicale.
1878	*Parona, Grassi, Bozzolo, Graziadei, Sonsino*, ecc.	L'Anchil. è causa dell'anemia dei fornaciai (anchilostomiasi, anchilostomo-anemia). La sua presenza si rileva dalla presenza delle uova nelle feci.
1880	*Perroncito, Bozzolo, Pagliani, Concato*, ecc.	L'Anchil. è la causa dell'anemia negli operai del Gottardo. L'infestazione avviene per la via boccale.
1881	*Perroncito, Fabre, Riembault, Binz*, ecc.	L'Anchil. è una delle principali cause dell'anemia dei minatori.
1882	*Leichtenstern, Menche*	L'anemia dei fornaciai in Germania è prodotta dall'Anchilostoma.
1882 e seg..	*Bätz, Stammeshaus, Kynsey, Mac Concl, Hogg, Below, Hughes, Walker*, ecc.	L'Anchil. compare nell'Asia (Giappone, Indie, Assam, Ceylon) e nell'Australia.
1889	*Zinn* e *Jacoby*	L'Anchil. è di regolare presenza nella Nuova Guinea, Africa orientale ed occidentale, Natal, Transvaal.
1901	*Looss*	L'Anchil. penetra per la via cutanea.
1903	*Stiles, Smith, Craig, Stockmann* . .	L'Anchil. è frequente nell'America del Nord, (Texas, Stati Uniti) e si rinviene anche in Scozia.

L'*Ankylostomum* vive nella zona calda ed in quella temperata e la sua distribuzione geografica fino ad ora è compresa fra il 57° latitud. nord ed il 35°-40° latitud. sud.

In *Italia*, ove fu scoperto la prima volta, è stato segnalato in quasi tutte le sue provincie, però, al presente la Sicilia e l'Umbria sono le maggiormente infestate; non manca per altro che qualche nuovo caso venga di quando in quando a rivelarci nuovi centri di diffusione.

Per quel che riguarda la provincia di Roma può dirsi che fino ad ora essa ne è del tutto immune. I casi illustrati dal Marchiafava e dal Bastianelli, come quelli riscontrati dal Bignami e dall'Angelini, dallo Schüpfer e De Rossi, da me e da altri, si riferiscono a persone provenienti da luoghi ove la malattia era straordinariamente diffusa. Non è stato fino ad ora registrato alcun caso in persona che non si sia mai allontanata dalla provincia.

La diagnosi dell'anchilostomiasi si fonda, oltre che in dati clinici, sul riconoscimento delle uova del parassita nelle feci. Le uova si trovano assai facilmente giacchè il più delle volte sono assai numerose, ma, data la loro grande trasparenza, possono facilmente passare inosservate: occorre quindi usare i più piccoli diaframmi.

La malattia è accompagnata sempre da eosinofilia (10-17 % ed anche più).

Per la profilassi vedi *Epidemiologia*.

Necator americanus (W. Stiles).

Fu scoperto da Stiles nel 1902. Si riteneva che fosse esclusivo del nuovo continente ma in seguito alle osservazioni mie, del Pieri, del Siccardi, ed in

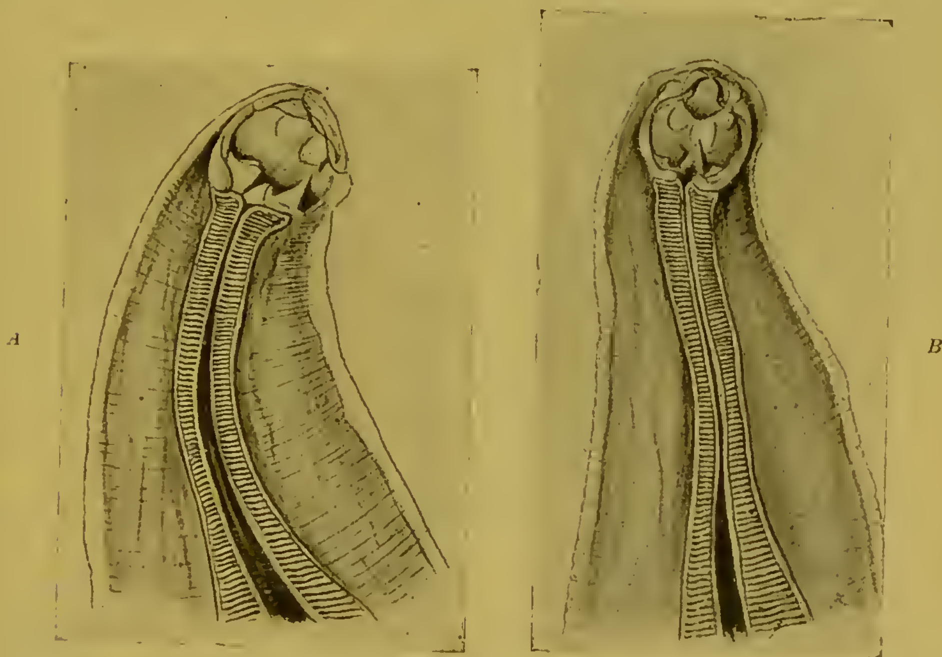


Fig. 321. — *Necator americanus*. Estremità anteriore e capsula boccale. *A*, di profilo; *B*, dal lato dorsale.

seguito di vari altri autori si è constatato che da tempo (1) venne importato dall'America in Italia e va diffondendosi sempre più tanto fra noi quanto in buona parte dell'Europa.

(1) La mia prima osservazione fu fatta all'ospedale di Santo Spirito in un individuo che proveniva dal Brasile nel 1902 e comunicata in quello stesso anno in una delle sedute della Società Zoologica Italiana.

Anche ad occhio nudo si diversifica subito dall'*Ankylostomum duodenale*. Infatti i caratteri macroscopici consistono: in una maggiore curvatura della porzione cefalica sul lato dorsale e nell'avere il maschio la borsa caudale di colorito bruno. Ma per scorgere meglio i caratteri che differenziano questa specie da quella europea bisogna ricorrere all'esame microscopico.

Le principali differenze consistono nella conformazione della capsula boccale, nella struttura della borsa copulatrice del maschio, e nella terminazione caudale della femmina.

La capsula boccale (fig. 321) infatti non ci presenta i denti caratteristici nel lato ventrale, ma invece questo lato è munito di due lamine chitinose terminate ad uncino: di più dal fondo del lato dorsale di essa si parte un dente conico robusto che si dirige in alto e raggiunge il bordo libero della capsula stessa. Lateralmente all'apertura faringea esistono due piccole lamine faringee ed altre due simili sono situate nel fondo ventrale della capsula boccale.

Inoltre la capsula boccale ci presenta degli ispessimenti festonati (tre per lato) che ritengo essere i muscoli costrittori della membrana cuticolare che circonda la capsula, i quali con il loro contrarsi imprimono dei movimenti di chiusura ed apertura alla apertura boccale.

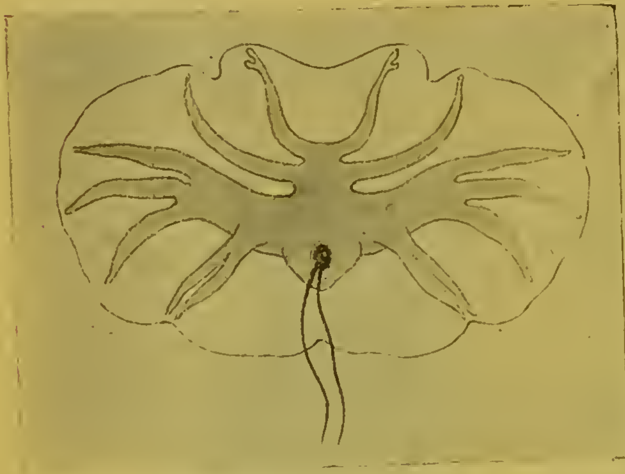


Fig. 322. — Borsa caudale del maschio di *Necator americanus* (schematica).

La borsa caudale del maschio (fig. 322) ha il lobo dorsale piccolo e ondulato poichè ci offre nel suo mezzo una leggera insenatura. Già ad occhio nudo si nota che i margini sono coloriti in scuro e ciò è dovuto alla scabrosità di essi specialmente nella superficie esterna. Il maggior spessore che in questi punti acquista la cuticola e forse la maggior facilità di trattenere il colore dei succhi biliari, data le rugosità della superficie, fanno ad essa borsa caudale assumere quella tinta bruna che facilita la ricerca dei maschi di *N. americanus* in mezzo a molti altri dell'*A. duodenale*.

La disposizione delle coste offre anche delle modificazioni: la dorsale infatti è bipartita in tutta la sua lunghezza e ciascuna di queste diramazioni è suddivisa in due digitazioni di cui la sola interna, più lunga, raggiunge il margine; le dorso-laterali partono dalla base del tronco dorsale e le coste laterali hanno origine da un tronco unico insieme alla ventrale che è divisa solo per circa la metà della sua lunghezza. Gli spicoli sono lunghi e sottili. L'estremità caudale della femmina è retta, acuta e manca dell'appendice lesiniforme che abbiamo osservata nell'*A. duodenale*.

Le uova sono anche esse elissoidi ma hanno un aspetto più allungato; infatti pur avendo lo stesso diametro trasversale (32-43 μ) hanno quello longitudinale maggiore giacchè raggiunge i 76 μ.

Si comporta come l'*A. duodenale* sia per quanto riguarda l'evoluzione, sia per i modi di infestazione nell'uomo, sia per la malattia ch'esso determina.

Fam. Trichotrachelidae.

Trichocephalus trichiurus (Lin). (*T. dispar* Rud.) (fig. 323).

È un Nematode olomiario, biancastro, assai caratteristico. Il suo corpo è diviso in due porzioni: l'anteriore filiforme sottile come un capello, la posteriore ingrossata. Il maschio, lungo 40-45 mm., ha la coda ravvolta a spira con concavità dorsale; presenta un solo spicolo situato in una borsa (guaina



Fig. 323. — *Trichocephalus trichiuris* maschio e femmina.

o prepuzio) munita di spine aguzze e assai ravvicinate. La femmina può raggiungere i 50 mm.; l'estremità caudale è corta conica; l'ano è subterminale e la vulva è situata al punto di unione delle due parti del corpo. Le uova sono di colorito bruno-rossastro, hanno forma di limone: il guscio è spesso, e presentano ai due poli una specie di turacciolo assai chiaro e refrangente; misurano 50 μ di lunghezza per una larghezza di 22-24 μ (fig. 324). Il Tricocefalo ha uno sviluppo diretto simile a quello dell'Ascaride e come questo è assai resistente al caldo, al freddo e alla siccità. La trasmissione si fa per mezzo delle acque, delle verdure crude non lavate e per il tramite delle mani stesse.

Una volta giunto nell'intestino si localizza nel cieco e nella appendice, raramente nel colon. Qui infigge la sua porzione anteriore nella mucosa intestinale e se nelle autopsie si rinvengono o liberi nel lume intestinale od anche adagiati sulla mucosa dell'intestino e mai infissi nella mucosa stessa, ciò si deve al fatto che le necroscopie si praticano qualche tempo dopo la

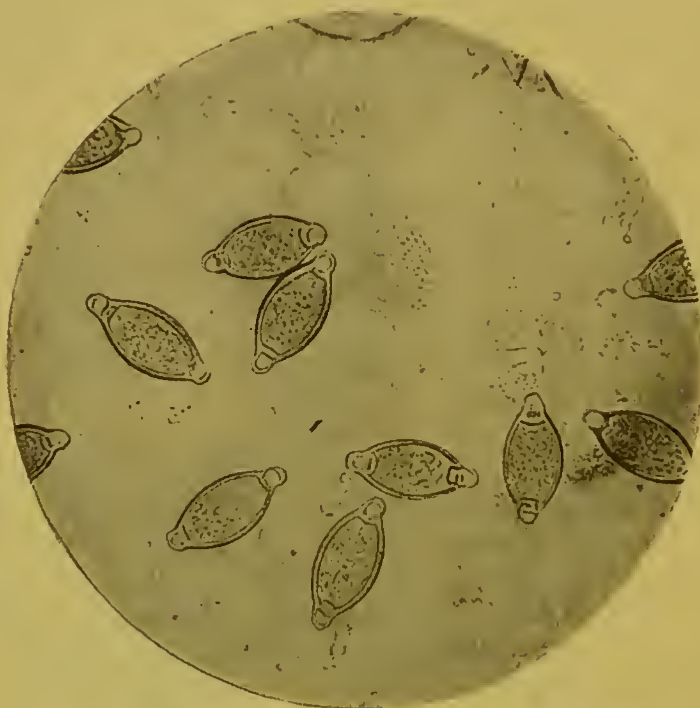


Fig. 324 — Uova di *Trichocephalus trichiuris* (dal vero).

morte (24 ore almeno) quando cioè, per il raffreddamento del cadavere, il parassita si è già distaccato: ma basta uccidere un animale che ospiti tricocefali (pecore, buoi, istrice, tasso, ecc.) e se ne faccia subito la sezione, si potrà facilmente constatare la penetrazione e la tenace infissione di esso nello spessore delle pareti intestinali.

A me è occorso più volte, specialmente nelle pecore, di rinvenire i Tricocefali così fortemente infissi nella mucosa da non poterli raccogliere sani, tanto è la resistenza che oppongono alla trazione.

Il Tricocefalo si può nutrire di sangue ed esercita oltre ad un'azione sottrattiva e traumatica anche un'azione tossica che specialmente nei bambini conduce ad un notevole grado di anemia. Ne ho potuto osservare parecchi casi guariti completamente dopo l'espulsione del verme. Questa è difficilissima ad ottenersi sia per la sede del parassita stesso, sia anche per il suo modo di adesione. È un verme cosmopolita. La diagnosi si fa con l'esame delle feci. La profilassi è la stessa di quella consigliata per l'Ascaride e per l'Ossiuride.

Trichinella spiralis (Owen).

È un Verme appena visibile ad occhio nudo: ha la porzione anteriore più sottile della posteriore. La bocca terminale piccola ed inerme. Il maschio misura mm. 1.4-1.6 di lunghezza per una larghezza di mm. 0.04. La termi-

nazione caudale alquanto ingrossata ci presenta due appendici digitiformi le quali, come le branche di una pinza, servono a tener ferma la femmina durante l'accoppiamento. In mezzo ad esse si apre la cloaca. Non vi sono spicoli. La femmina è più lunga, misura 3-4 mm. per una larghezza di mm. 0.06. La vulva si apre nel 1° quinto anteriore del corpo. Essa è vivipara.

La Trichina vive allo stato adulto nell'intestino tenue dell'uomo e di molti mammiferi (ratto, topo delle chiaviche, maiale, cinghiale, cane, volpe, tasso, gatto) e se l'infestazione è intensa può riscontrarsi anche nel crasso.

L'evoluzione fu studiata nei ratti. Il parassita giunge nell'uomo sotto forma di larva incistata insieme alla carne del maiale. Giunta nello stomaco la cisti vien digerita e la giovane Trichina arriva nell'intestino. Qui si accresce assai rapidamente e già dopo 48 ore, da che avvenne l'infestazione, si trovano i maschi e le femmine atti all'accoppiamento. Avvenuta la copula i maschi muoiono e le femmine fecondate traversano la parete dell'intestino, giungono nello spessore dei villi, nelle glandole di Lieberkühn e nei gangli mesenterici, ove, trascorsi altri 4 o 5 giorni cominciano a partorire.

La maggior produzione di embrioni si ha durante la prima settimana, ma il parto dura un mese circa; durante questo periodo ciascuna femmina è capace di dar nascita a 10-15,000 embrioni.

Una volta terminato il parto essa muore e viene espulsa con le feci. Gli embrioni intanto, che al momento della nascita misurano 90 μ di lunghezza per 6 μ di larghezza, emigrano attraverso la parete dell'intestino e per la via sanguigna (Żenker, Kühn, Colberg) o per la linfatica (Cerfontaine, Askanazy) od anche per contiguità di tessuti (Chatin) giungono alla sede di predilezione. Questa può mancare quando si tratti di un caso gravissimo, ma se tale non è, allora per ordine di frequenza, vengono invasi: il diaframma, i muscoli intercostali, quelli della spalla, della gola, del collo; gli psoas, i crurali, ecc. Nei muscoli lunghi si trova di preferenza verso le estremità tendinee.

La presenza della larva nel muscolo determina una irritazione che conduce alla formazione della cisti entro alla quale la larva continua a crescere. Quando questa ha raggiunto il massimo sviluppo, la cisti si presenta sotto forma di un corpo ovoide, trasparente, con i poli allungati e ristretti in guisa da assumere la forma di un limone, con l'asse maggiore secondo la direzione delle fibre (fig. 325). La sua lunghezza è variabile da mm. 0.30 a mm. 0.80 e larga da mm. 0.20 a mm. 0.40. Per lo più ogni cisti è isolata dall'altra, ma qualche volta se ne vedono 3-4 una dietro l'altra. Nell'interno di ognuna di esse esiste una Trichina sola: però alle volte se ne trovano 2, 3, fino a 6.

Il Verme si vede per trasparenza nell'interno delle cisti ravvolto a spira, e in questo stato attende che un altro ospite l'ingerisca per continuare nello sviluppo. Se ciò non avviene cominciano a manifestarsi i fenomeni regressivi, sotto forma di degenerazioni grassa e calcarea.

La prima comincia a manifestarsi ai due poli della cisti con deposito di goccioline di grasso le quali, aumentando, la avvolgono poi tutto intorno e in ultimo il grasso si infiltra nell'interno ed invade anche il Verme, che muore. In fine poi subentra la degenerazione calcarea. Allora la cisti diviene opaca ed anche ad occhio nudo possono scorgersi dei piccolissimi punti bianchi, madreperlacei.

Ma questi stati regressivi cominciano generalmente assai tardi, giacchè essi non si iniziano mai prima del settimo mese e sono completi solo al 15° e 18° mese.

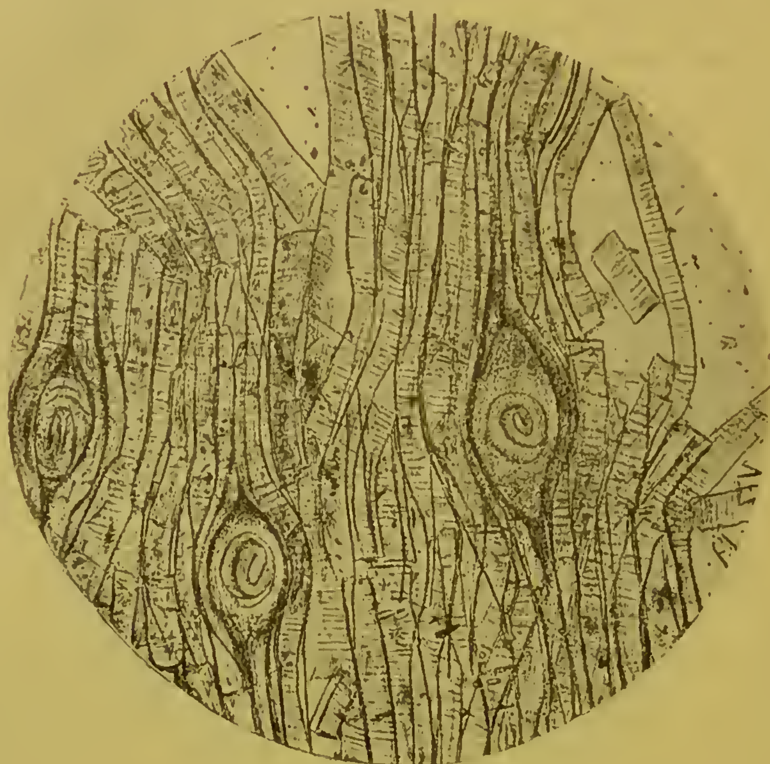


Fig. 325. — *Trichina* incistata (dal vero).

Nell'interno delle cisti quindi la larva può vivere a lungo ed in tal caso ci presenta una vitalità ed una resistenza davvero sorprendente.

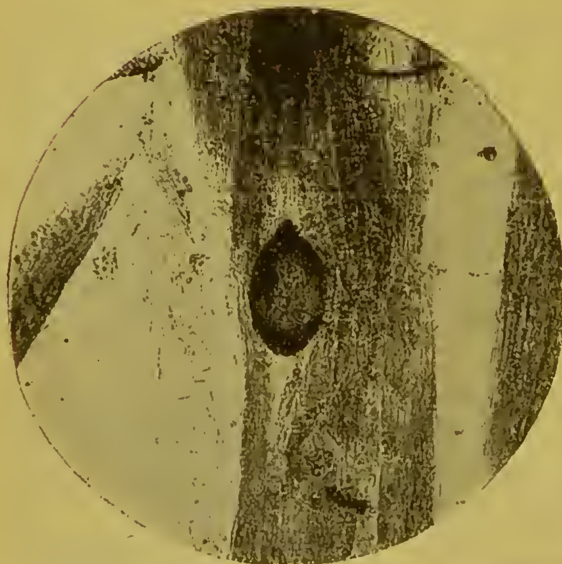


Fig. 326. — *Trichina* incistata in via di calcificazione (dal vero).

Dalle ricerche di vari autori si giunge alle seguenti conclusioni: La trichina muore se esposta al calore per 5 minuti in H_2O a 55°, dopo 10'-15' a 54° e dopo 20'-30' a 52°.

La carne trichinata deve subire l'ebollizione per un tempo proporzionale al peso e cioè mezz'ora al minimo per ogni chilogramma. Per la carne arrostita occorre attenersi alle stesse prescrizioni che per la cisticercosi.

Il freddo normalmente non può adoperarsi giacchè per uccidere con sicurezza le Trichine occorre tenere le carni a — 25° per più di 3 giorni.

Anche la salagione ha poca importanza giacchè furono trovate trichine vive in prosciutti salati da più di un anno.

L'affumicamento può servire solo quando è talmente prolungato che agisce anche l'essiccamento, o quando con esso concorre la temperatura.

Inoltre la Trichina resiste più d'ogni altro parassita all'azione di agenti chimici (estratto di felce maschio, semen contra, radice di granato, trementina, cloroformio, benzina, ecc.) ed anche alla putrefazione, poichè si son trovate Trichine vive dopo cento giorni da che era morto l'ospite.

La diagnosi si fa esclusivamente con l'esame microscopico. Questo non presenta alcuna difficoltà: basta prelevare uno o più frammenti di carne, dilacerarla in una goccia di soluzione fisiologica, schiacciarla delicatamente fra due vetrini ed osservarla al microscopio. Non è altrettanto facile però stabilire se una Trichina sia viva nella carne in esame. Possiamo assicurarci di ciò in più modi:

a) col provarne la vitalità esponendola al calore di 35-40 gradi sul tavolino di Schultze e constatandone i movimenti, ciò che si vede assai bene se prima si ha cura di sottoporre la carne alla digestione in pepsina acidulata con acido cloridrico, per 3 ore alla temperatura di 37° in guisa da mettere in libertà completa le Trichine;

b) per mezzo della colorazione con azzurro di anilina o con picrocarminio che colorano le Trichine solamente quando sono morte, mentre se son vive non vengono tinte e spiccano assai bene sui muscoli colorati;

c) col far ingerire una discreta quantità di carne sospetta ad un animale d'esperimento (cane, gatto, cavia, ecc.) nel quale si seguirà il corso della malattia e si ricercherà in seguito il parassita incistato nelle carni.

La Trichina è frequente nella Germania del Nord e nell'America del Nord. In Italia è stata constatata una volta sola nell'uomo dal dott. Legge a Camerino ed una nel cane a Torino dal Perroncito.

Si può prevenire la trichinosi con la distruzione delle carni invase da larve di Trichina. Occorre quindi sopratutto una sorveglianza assai accurata delle carni che vengono importate già confezionate e di quelle de' maiali provenienti dall'estero e principalmente dai luoghi notoriamente infesti. Inoltre è necessario mangiare le carni assai ben cotte ed esposte a quella temperatura che fu giudicata necessaria ad uccidere il Verme.

Fam. **Filaridae.**

Le Filarie sono dei Nematodi filiformi con bocca variabile, munita ora di labbra, ora invece di papille, ora completamente inerme. I maschi hanno la coda ravvolta a spira con un solo spicolo o due spicoli disuguali. Le femmine presentano un ovaio doppio ed una vulva situata verso l'estremità anteriore. Ovovivipare o vivipare.

Abitano le sierose, il tessuto connettivo e il sistema emo-linfatico.

Gli embrioni, quando vivono liberi nel sangue, prendono il nome di *Microfilarie* per distinguerli dagli adulti che chiamansi *Macrofilarie.*

Fra le specie parassite quelle di cui si conosce meglio il ciclo evolutivo e la cui azione patogena per l'uomo è provata sono le seguenti:

TABELLA 97.

Specie	Habitat dell'adulto	Habitat degli embrioni	Ospite	Ospite intermedio o agente trasmettitore
Filaria Bancrofti .	sistema linfatico (vasi, gangli, condotto toracico)	liberi nel sangue	uomo	*Culicinae:* Culex, Stegomyia, Mansonia, Scutomyia, Taeniorhynchus *Anophelinae:* Myzomyia Pyretophorus, Myzorhynchus
Filaria loa	spazi linfatici del tessuto congiuntivo superficiale	liberi nel sangue	uomo	Tabanus? Glossina?
Filaria conjunctivae	congiuntiva bulbare, legamento gastro-splenico, tessuto sottocutaneo	?	uomo	Chrysops?
Filaria medinensis.	tessuto congiuntivo sottocutaneo	dapprima liberi, poi nell'ospite intermedio	uomo	Cyclops

Filaria Bancrofti (Cobbold).

È un piccolo Verme bianco-opalino, trasparente, a cuticola liscia, attenuato alle due estremità che sono ottuse. Bocca inerme. Il maschio è lungo circa 40 mm., largo mm. 0.10, con l'estremità caudale un po' ravvolta a spirale con due spicoli disuguali. La femmina ha una lunghezza di 8-10 centimetri e una larghezza di 0.24-0.30 mm. La vulva è situata ad un millimetro circa dall'estremità anteriore e le uova, che si vedono bene per trasparenza entro l'utero in varî gradi di sviluppo, misurano 40 × 25 μ.

Da adulta abita il sistema linfatico (vasi, gangli e forse anche il canale toracico). Vivono per lo più in gruppi, un maschio per più femmine, formando ammassi che impediscono il deflusso della linfa: la loro presenza determina anche irritazione locale.

Gli embrioni (*Microfilaria nocturna*) vivono nel sangue, sono filiformi, cilindrici, arrotondati anteriormente, appuntati posteriormente, misurano μ. 300 × 8, sono contornati da una guaina sottile, fragile, più lunga di essi. ma dello stesso diametro (fig. 327). L'embrione porta esteriormente un rostro conoide retrattile, terminato da un dardo.

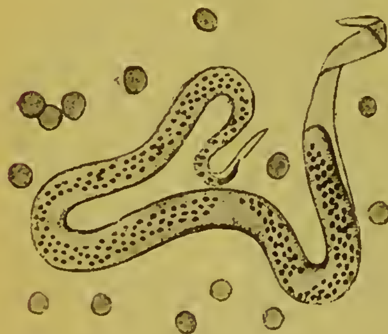


Fig. 327. — *Microfilaria Bancrofti* (dal Manson).

Presentano la curiosa particolarità di giungere nella circolazione periferica durante la notte (*F. nocturna* Manson), dalla mezzanotte cioè alle prime ore del mattino: ma ciò non può essere in relazione nè colla temperatura nè con la pressione sanguigna, nè con la luce, perchè oramai è dimostrato che invertendo le ore del riposo e del dormire esse vengono sempre alla periferia durante il sonno.

Sebbene si sia cercato di dare varie spiegazioni a questo fenomeno della periodicità, la più attendibile è quella che la fa dipendere da modificazioni chimiche le quali avvengono nel nostro organismo durante il sonno. In ogni modo è certo che l'emigrazione periferica

notturna, che è la normale, sta in relazione con le abitudini degli agenti trasmettitori.

Durante le ore del giorno, o, per dir meglio, durante quelle dell'attività, gli embrioni, secondo Manson, vivrebbero sopratutto nei vasi pulmonari, nel ventricolo sinistro e nei muscoli cardiaci.

Questo fatto si verifica anche in una Filaria del cane: la *F. immitis*.

L'evoluzione della *F. Bancrofti* si compie in una zanzara.

Ciò supposto da Bancroft, fu dimostrato da Manson. Gli embrioni, succhiati dalle zanzare col sangue, nello stomaco di esse perdono la guaina: con la loro armatura anteriore perforano il tubo digestivo, vanno nella cavità generale, emigrano nei muscoli del torace e dell'ala, subiscono qui delle trasformazioni e dopo 15 giorni la metamorfosi è completa. Le larve al massimo dello sviluppo sono piccoli vermi lunghi mm. 1,7 × 30 μ.

Raggiunta questa fase di evoluzione lasciano il torace, emigrano nel protorace, nel collo fino alla testa, alla base della tromba, ai palpi ed al *labium*. Mentre la zanzara punge, esse uscirebbero dal punto di unione del *labium* con i labelli e penetrerebbero attraverso la ferita fatta dalla zanzara stessa, guadagnando i vasi linfatici ove si accrescono, divengono adulte e si fecondano.

Gli embrioni, che vivono nel sangue, sembra non producano disturbi speciali. La presenza invece della Filaria adulta nei vasi linfatici determina l'ostruzione di essi, occasionando linfangiti, varici linfatiche, idrocele chiloso, linfoscroto, chiluria, ematochiluria, ascite chilosa, nonchè le varie elefantiasi dello scroto, della vulva, delle mammelle, degli arti, ecc.

La *filariosi* è una malattia propria delle regioni tropicali ed è diffusa nell'Asia orientale, nell'Africa, nell'America centrale e nell'Oceania. In Europa si constatarono due casi autentici uno a Canet de Mar vicino a Barcellona e l'altro, descritto dal Biondi, in Siena.

La diagnosi non può fondarsi esclusivamente sulla sintomatologia, ma potrà esser fatta con sicurezza solo quando si rinvengano gli embrioni nei liquidi chilosi ove rimangono anche durante il giorno o nel sangue esaminato di notte e preferibilmente durante il sonno.

La profilassi, essendo la malattia trasmessa dalle Zanzare, dovrà mirare alla difesa contro la puntura di questi insetti e ad impedire che i malati vengano punti dalle Zanzare stesse, le quali potrebbero in tal modo diffondere la malattie.

Filaria loa (Guyot) (fig. 328).

È la Filaria che forse si conosce da più tempo (1598). È un piccolo verme filiforme, cilindrico, biancastro, caratterizzato dall'avere la cuticola con numerose protuberanze rotondeggianti e liscie, disposte irregolarmente, che divengono più rare e più piccole verso gli estremi del corpo i quali sono lisci. L'estremità anteriore, ristretta bruscamente, è inerme e termina con una bocca piccola, stretta, infundibuliforme. A breve distanza della bocca esistono due piccole papille, una dorsale, l'altra ventrale. Il maschio misura 30-34 mm. di lunghezza con una larghezza massima di 300-400 μ nella parte anteriore del corpo. L'estremità posteriore è leggermente incurvata. L'apertura cloacale è subterminale e si apre nel mezzo della faccia ventrale, fra due espansioni laterali della cuticola. L'organo copulatore è rappresentato da due spicoli disuguali alquanto arcuati.

La femmina misura in media mm. 40-50 di lunghezza su una larghezza di 500 μ; ha la porzione anteriore alquanto ingrossata e l'estremità posteriore assottigliata, diritta e bruscamente arrotondata all'apice. L'ano è subterminale e si apre su di una papilla, mentre la vulva è anteriore, dista 2 mm. circa dall'apice boccale ed è situata su una piccola prominenza.

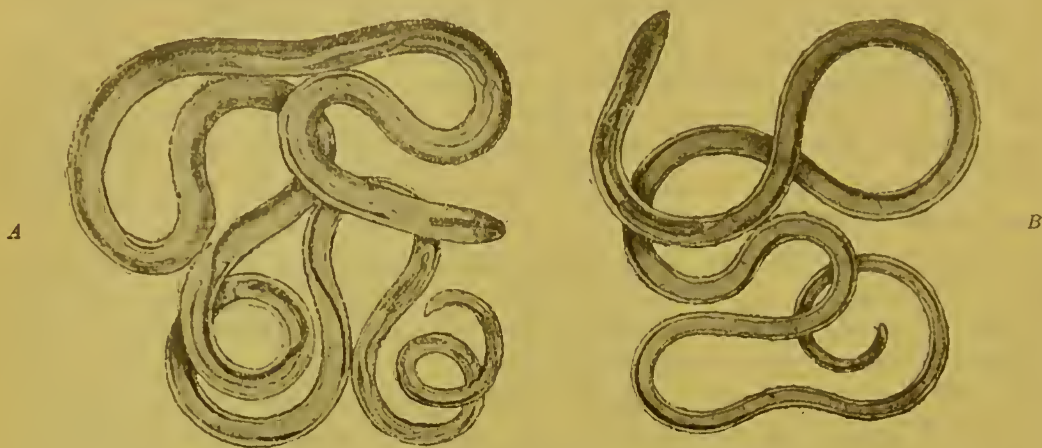


Fig. 328. — *Filaria loa. A*, femmina; *B*, maschio (dal Loos).

Giovane è parassita del tessuto connettivo superficiale, ove compie delle continue escursioni, ma più spesso fu rinvenuta in vicinanza dell'occhio ed anche sotto la congiuntiva.

La sua presenza è accompagnata da pruriti cutanei ed edemi fugaci e sembra anche che i così detti tumori di Calabar, i quali ad intervalli irregolari e per lo spazio di più anni si manifestano e scompaiono negli abitanti di alcuni distretti dell'Africa occidentale tropicale, siano dovuti alla presenza della *F. loa* nell'organismo.

Gli embrioni (*Microfilaria diurna*) simili a quelli della *F. Bancrofti* compaiono nella circolazione periferica durante le ore del giorno e molto probabilmente compiono il loro ciclo di sviluppo in un insetto ematofago ad abitudini diurne (*Tabanus*, *Haematopota*, *Chrysops*, *Glossina*, *Stomoxys*, ecc.).

Filaria conjunctivae (Addario).

Di questa specie si conosce la sola femmina. La sua lunghezza varia dagli 11 ai 20 cm., è filiforme, biancastra, leggermente appiattita. La sua larghezza è all'incirca ½ mm., salvo ai due estremi, di cui il posteriore è più attenuato dell'anteriore.

La cuticola, spessa 9 μ, ci presenta delle strie trasversali delicate e delle strie longitudinali un po' più accentuate, ed è sottile e trasparente alle due estremità. La testa è liscia, smussa, priva di papille: la bocca è terminale inerme, molto piccola, simile ad un forellino che perfora la cuticola, al di là della quale si allarga per continuarsi con l'esofago, anche esso breve ed inerme.

L'apparato genitale è costituito da due tubi ovarici, che occupano la massima parte della cavità del corpo, formando molte anse specialmente verso la parte posteriore di esso. Nella porzione anteriore, in prossimità dell'eso-

fago, le due anse si uniscono per formare la vagina che va a sboccare nell'apertura vulvare situata in vicinanza della bocca.

È ovovivipara e gli embrioni, che si vedono liberi entro l'utero, sono lunghi 350 μ e larghi 5 ½ μ ed hanno il corpo all'innanzi assottigliato e posteriormente terminante in una punta molto sottile.

L'habitat più comune di questa specie è l'interno del globo oculare dei cavalli, degli asini e dei muli.

Nell'uomo fu riscontrata quattro volte.

La prima osservazione si deve al Dubini, il quale dice solo di aver rinvenuto un verme lungo 115 mm. nell'occhio di un uomo senza precisare la sede, se sotto la congiuntiva cioè, oppure nella cavità oculare.

La seconda è quella del Babes (1880). Egli, praticando in Budapest la autopsia di una donna rinvenuta morta sulle rive del Danubio, riscontrò fra i due foglietti del legamento gastro-splenico un nodulo della forma di una lente, piano-convesso, largo 16 mm. e spesso 9 mm.

La terza è quella di Carmelo Addario (1885). Egli infatti descrive minutamente una *Filaria*, cui dà il nome di *F. conjunctivae*, che il dott. Vallada, chirurgo all'ospedale di Santa Marta in Catania, aveva rinvenuta in un tumoretto grosso come un pisello situato sotto la congiuntiva e poco sopra al cerchio sclero-corneale.

La quarta osservazione fu fatta da me (1) in una giovane donna nella quale da due anni si era sviluppata, nella faccia esterna dell'avambraccio sinistro al suo terzo superiore, una piccola tumefazione assai dolorosa, dalla quale venne estratto un esemplare di *F. conjunctivae* non perfettamente matura. Nulla si conosce del suo ciclo evolutivo, ma siccome questa specie è frequente nell'interno del globo oculare degli equini e siccome nel caso da me descritto difficilmente può pensarsi ad altri insetti pungenti, io sono indotto a credere che agente trasmettitore di esso possa essere il *Chrysops coecutiens*, piccolo Tafano, che suole di preferenza attaccare gli equini precisamente attorno all'occhio.



Fig. 329. — *Filaria medinensis* estratta col metodo sudanese, ravvolta ad un bastoncino (dal vero).

Filaria medinensis (Velsch) (fig. 329).

La femmina di questo Nematode può raggiungere un metro di lunghezza e un millimetro o poco più di diametro. Il corpo è cilindrico, quasi uniforme, bianco-latteo, liscio con l'estremità caudale bruscamente ricurva a guisa di uncino. La estremità cefalica è smussa e presenta un ispes-

(1) G. Alessandrini. *Nuovo caso di « Filaria conjunctivae » Add. parassita dell'uomo.* Bollettino R. Accad. medica di Roma, anno XXX, II, 1906.

simento cuticolare (*scudo cefalico*) in mezzo al quale si apre la bocca a sezione triangolare, piccolissima, munita di 6 papille, delle quali due più grandi delle altre (fig. 330). L'orificio vulvare sembra che vada ad aprirsi subito dopo l'anello delle papille circum-orali; l'ano non si riesce a scoprire.

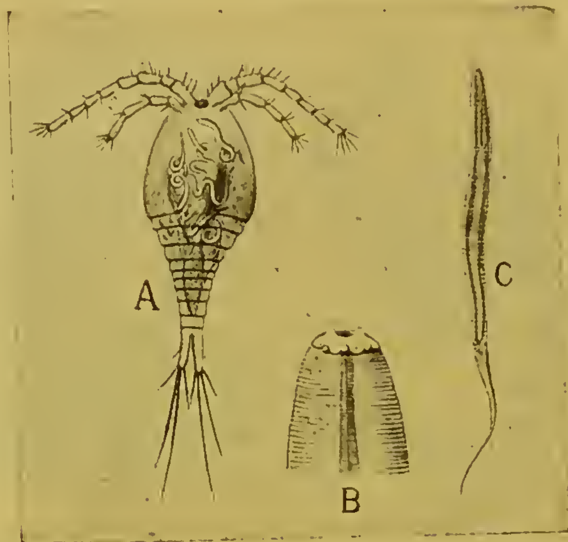


Fig. 330. — *Filaria medinensis*. A, embrioni in un *Cyclops*; B, estremità cefalica di un verme adulto; C, embrione.

La cavità interna del corpo è completamente occupata dall'utero, il quale, dopo l'avvenuta fecondazione, si riempie di miriadi di embrioni aggomitolati su loro stessi. Poco o nulla si sa del maschio.

La femmina adulta vive nel tessuto connettivo degli arti e del tronco e una volta fecondata si avanza nei tessuti fino a raggiungere la superficie cutanea specialmente degli arti inferiori (85 % dei casi). Qui giunta, per effetto d'una sostanza irritante che è capace di segregare, determina una specie di flittena che non tarda ad aprirsi nel centro e farci vedere la testa del verme. Da essa, attraverso l'apertura boccale o per un'apertura al disotto di questa, fa ernia una porzione dell'utero, dalla quale vengono messi in libertà numerosi gli embrioni. Questi misurano 500-700 μ di lunghezza per 15-25 di larghezza. Sono striati trasversalmente, alquanto appiattiti, un po' ristretti in avanti, con una coda lunga, sottile, terminata in punta smussa.

Giunti nell'acqua restano vivi qualche giorno e se si incontrano con un piccolo crostaceo del genere *Cyclops*, che serve loro di ospite intermedio, penetrano attivamente nell'interno del suo corpo attraverso gli spazi che separano i vari segmenti del carapazio. Gli embrioni deglutiti dai *Cyclops* muoiono. Nell'interno dell'ospite subiscono delle mute e, dopo circa un mese, han raggiunto il massimo dello sviluppo larvale.

Il Fedschenko studiò l'evoluzione degli embrioni della *Filaria medinensis* e suppose che l'uomo si infestasse bevendo le acque in cui nuotano i *Cyclops*, ma la prova sperimentale di ciò spetta al Leiper [che riuscì ad infestare delle scimmie.

Le larve quindi, penetrate in questo modo nell'organismo, emigrano e raggiungono i tessuti profondi ove divengono mature. La forma morbosa pro-

dotta da questo parassita, è nota da molto tempo e forse i *serpenti di fuoco* circolanti sotto la pelle degli Ebrei al passaggio del Mar Rosso, altro non erano che *F. medinensis*. Questa malattia prende il nome di *Dracontiasi* o *Dracunculosi:* è originaria dell'Africa e specialmente lungo la vallata del Nilo, nel paese dei Gallas ed in Abissinia, si è estesa poi all'Asia, ove è frequente sulle coste del Mar Rosso, nell'interno dell'Arabia (Medina) e giunge fino nella Persia e Turkestan.

Nell'America è ora frequente nelle Guiane e nella provincia di Bahia nel Brasile.

La profilassi consiste nell'evitare di bere acque impure e nel procurare che quelle potabili non possano venire infestate.

Fam. **Angiostomidae.**

In questa famiglia si comprendono quei Nematodi che hanno due generazioni: una sessuata che vive libera nell'ambiente esterno, l'altra asessuata che conduce vita parassitaria.

Come parassita dell'uomo noi conosciamo il gen. *Strongyloides* con una sola specie che prese il nome di *Strongyloidès intestinalis* (Bavay, 1877) per la forma vivente nell'intestino umano e di *Str. stercoralis* (Bavay) per quella che si riscontra libera nell'ambiente.

a) *Forma asessuata* (*parassita, intestinale* o *strongiloide*). Questa è rappresentata esclusivamente da femmine partenogenetiche. Sono de' piccoli vermi filiformi lunghi mm. 2-2.2 con un diametro di 35 μ. Il corpo è un po' ristretto all'innanzi e terminato posteriormente da una coda conica. La bocca è munita di tre piccole labbra; ad essa segue un esofago cilindrico il quale occupa il quarto della lunghezza del corpo e si continua con un intestino da cui si differenzia solo per la tinta. L'ano è sotto forma di una fessura trasversale situata alla base della coda: la vulva è al terzo posteriore del corpo. L'utero contiene poche uova, giallo-verdastre, elissoidi, che misurano 50-58 per 30-34 μ (fig. 331).

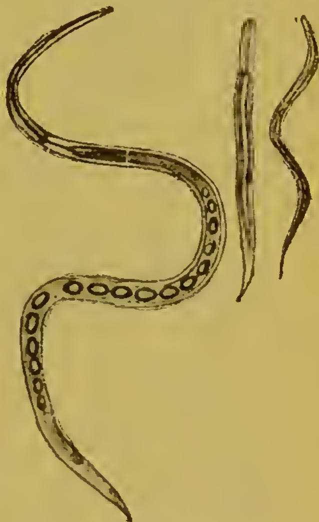


Fig. 331. — *Strongyloides intestinalis* femmina e maschio (dal Braun).

b) *Forma sessuata* (*libera, stercorale, rabditoide*). Questa è rappresentata così da maschi, come da femmine. Hanno il corpo cilindrico, liscio, ristretto alle due estremità, ma più posteriormente. La bocca è trilabiata. Ad essa segue un breve vestibolo, nel quale si protende l'esofago che ha forma di clava ed è seguito a breve distanza da un bulbo faringeo piriforme, il quale possiede nell'interno tre piccoli denti chitinosi disposti ad Y. L'intestino, alquanto dilatato anteriormente, si restringe verso la parte posteriore e termina nell'ano, che sbocca in una piccola protuberanza situata alla base della coda.

I maschi misurano mm. 0.7 di lunghezza ed hanno un diametro di 35 μ. ci presentano la coda ricurva e sono armati di due spicoli uguali, corti, tozzi, ricurvi e canicolati.

Le femmine lunghe un millimetro e larghe 50 μ hanno una coda allungata a lesina e alquanto ondulata. La vulva è situata alla metà circa del corpo un po' a destra.

Le uova elissoidi, di colorito giallastro, hanno guscio sottile e misurano μ 70 × 40, e giungono a maturità nell'utero stesso ove qualche volta anche si schiudono, lasciando in libertà una larva *rabditoide* lunga 200-300 μ e larga 14-16 μ. Essa cresce rapidamente e, dopo aver subito una muta e aver raggiunto una lunghezza doppia della prima, assume l'aspetto di larva strongiloide il cui esofago è subcilindrico ed assai lungo (fig. 332).



Fig. 332. — *Strongyloides stercoralis*. A, femmina; B, maschio; C, animali accoppiati; D, uovo embrionato; E, larva strongiloide (dal Brumpt).

Queste larve strongiloidi sono destinate a continuare il loro sviluppo nell'organismo umano, ove possono giungere tanto per la via boccale, come anche, secondo le dimostrazioni del van Durme, Marzocchi, ecc., per la via cutanea.

Pervengono quindi nell'organismo come quelle dell'*Ankylostomum*. Giunte nell'intestino si trasformano in femmine partenogenetiche le quali per lo più vivono nello spessore della parete dell'intestino stesso. Le uova da esse deposte si sviluppano nel lume intestinale, ma qualche volta anche nell'ambiente esterno ove giungono insieme con le feci.

Lo *Strongiloides intestinalis* è fra noi abbastanza comune e specialmente se in gran numero, può determinare disturbi intestinali e alle volte una vera anemia, simile a quella che produce l'*Ankylostomum*, con il quale del resto molto spesso vive insieme parassita.

Si può espellere facendo uso di estratto etereo di falce maschio, ma in qualche caso da me osservato, ho trovato una resistenza ed una grande difficoltà a liberarsene.

La diagnosi si fonda esclusivamente sull'esame degli escrementi nei quali, anche *appena emessi*, si riscontrano le larve rabditoidi.

La profilassi, avvenendo l'evoluzione del parassita nelle stesse condizioni di ambiente che servono allo sviluppo delle larve d'Anchilostoma si confonde con quella d'anchilostomiasi.

2° Ord. **Acantocefali.**

Sono Nematelminti sprovvisti di tubo digerente con una tromba protrattile armata di uncini (fig. 333).

In quest'ordine si rinvengono due specie parassite dell'uomo: il *Gigantorhynchus gigas* (Goeze) ed il *G. moniliformis* (Bremser).

Il primo è rappresentato da un grosso parassita che vive abitualmente nell'intestino del maiale, ma che può riscontrarsi anche in quello dell'uomo.

Il suo corpo, un po' appiattito, è bianco latteo o bianco violaceo con striature trasversali. La tromba globosa è munita di 5 o 6 file di uncini



Fig. 333. — Testa di *Gigantorhynchus gigas*.

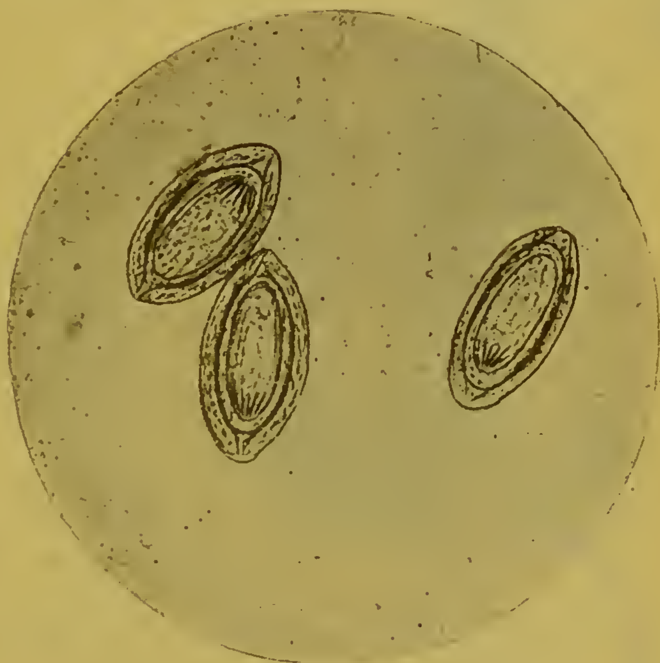


Fig. 334. — Uova di *Gigantorhynchus gigas* (dal vero).

ricurvi all'indietro; si retrae dentro un collo più grande, ma sempre molto più piccolo del resto del corpo.

I maschi misurano da 6 a 10 cm. ed hanno la porzione caudale terminata da una borsa campanuliforme.

Le femmine raggiungono i 35-40 cm. ed hanno la estremità caudale ottusa.

Le uova hanno tre inviluppi di cui il medio è più spesso; misurano 87-100 μ (fig. 334) e contengono nell'interno già sviluppato un embrione munito di uncini.

Se si estraggono dall'interno del parassita nei diversi punti dell'ovidutto si possono trovare uova con un solo o con due o tutti e tre i gusci, dei quali l'esterno è assai scabroso.

L'Echinorinco adulto si fissa alla parete del tubo intestinale dell'ospite con la sua tromba e vi determina delle lesioni che, alle volte, possono essere molto gravi, giacchè da una semplice ulcerazione intestinale, con infiammazione circostante, possono giungere ad una perforazione dell'intestino con passaggio del verme nella cavità addominale. Spesso la sua presenza è tradita dalla formazione di noduli bianco-perlacei nella parete esterna dell'intestino, che corrispondono al punto di adesione del parassita stesso e che vanno dalla grandezza di un grano di miglio a quella di un pisello (fig. 335).



Fig. 335. — Echinorinchi nell'intestino del maiale (dal Brumpt).

La diagnosi più che dai sintomi, che sono assai vaghi e che spesso possono passare inosservati o confondersi con quelli di altre malattie, si fonda esclusivamente dall'esame delle feci, ove si riscontrano abbondanti le caratteristiche uova.

Nulla di concreto vi è circa la cura.

Per quanto riguarda il ciclo di sviluppo possiamo dire che le uova, arrivate nel suolo, vengono ingerite dalle larve del *Maggiolino* (fig. 336) o di una *Cetonia:* nel loro intestino si schiudono, e gli embrioni, liberi, con i loro uncini perforano la parete intestinale e vanno ad incistarsi nella cavità del corpo, ove restano per molto tempo, anche dopo la trasformazione delle larve di questi coleotteri in insetti perfetti.



Fig. 336. — Larva di *Maggiolino*.

Se questi o intieri o in parte vengono mangiati dal maiale oppure, accidentalmente, dall'uomo, il giovane Echinorinco viene messo in libertà e, nell'intestino di questi ospiti definitivi, raggiunge il suo completo sviluppo.



Fig. 337. — *Gigantorhynchus moniliformis* (dal Brumpt).

Il *Gigantorhynchus moniliformis* (Bremser), (fig. 337).

È una specie che vive frequentemente nell'intestino dei ratti, dei topi delle chiaviche, delle arvicole, degli scoiattoli, dei ghiri. Ha il colorito bianco e le due estremità striate trasversalmente, mentre che il resto del corpo ci offre una serie di rigonfiamenti più o meno regolari. La tromba è munita di piccoli uncini assai incurvati disposti in 15 file trasversali, costituenti 12 strie longitudinali. Il maschio misura 4-5 centimetri e la femmina 7-10 centimetri. Le uova, di $85 \times 45\ \mu$, sono elissoidi: l'embrione è striato trasversalmente e ricoperto di spine che si fan tanto più grosse quanto più si avvicinano all'estremità anteriore.

L'ospite intermedio, secondo il Grassi e il Calandruccio, è un Coleottero: la *Blaps mucronata*.

Il Calandruccio, che ingoiò alcune larve incistate rinvenute in questo insetto, dopo 20 giorni fu colpito da violenti coliche accompagnate da diarrea, ronzii alle orecchie, stanchezza e sonnolenza. Dopo altri 16 giorni rinvenne nelle sue feci uova di Echinorinchi i quali, in numero di 53, vennero espulsi dopo somministrazione di felce maschio. Una volta liberatosi dei parassiti, tutti i disturbi cessarono dopo due giorni.

CLASSE: IRUDINEI o DISCOFORI.

Gli Irudinei o Sanguisughe sono dei parassiti temporanei giacchè abitualmente vivono nelle acque e si attaccano ai vertebrati solo nel momento in cui debbono prendere il loro nutrimento, che consiste esclusivamente in sangue.

La loro forma è caratteristica: appiattita nella faccia ventrale, è leggermente convessa nella dorsale. Il corpo è fusiforme, composto di una serie di anelli poco marcati, molto ravvicinati fra di loro esternamente e disposti in modo che non corrispondono ai segmenti interni, i quali sono in numero minore. Posseggono due ventose, una posteriore, circolare, grande ed impervia che serve di organo di adesione, l'altra anteriore, tagliata a becco di flauto, la quale costituisce la bocca sul cui fondo esiste l'apparecchio atto a ledere la cute. Questo, nelle specie che vivono parassite dell'uomo, è costituito da tre lamine o mascelle chitinose, semicircolari, provviste di un numero variabile di denti e disposte a raggio intorno all'apertura faringea. Queste mascelle, mosse da robusti muscoli, hanno il compito di incidere la pelle dell'ospite nel momento in cui i parassiti si accingono a sottrarne il sangue (fig. 338).



Fig. 338. — *Hirudo medicinalis*. A, verme sezionato per mostrare l'intestino saccato; B, ventosa anteriore aperta con le tre mascelle e il bulbo faringeo; C, mascella isolata; D, ferita prodotta dalle mascelle.

Le Sanguisughe producono generalmente una ferita triraggiata la cui cicatrice è indelebile.

Il sangue che sgorga dalla incisione penetra, per aspirazione del faringe nell'intestino. Questo è costituito da un tubo rettilineo che ci presenta lateralmente un numero variabile di tasche o saccoccie a fondo cieco, di guisa che la sua capacità aumenta in modo tale, che, quando l'animale è sazio, può raggiungere una grandezza di quattro o cinque volte maggiore di quando è digiuno. Una comune Mignatta può succhiare da 12 a 18 grammi di sangue.

Ora se si considera che, quando l'animale si è distaccato, sia per la forma triraggiata della ferita, sia per la inoculazione di una saliva anticoagulante secreta dalla Sanguisuga stessa, lo stillicidio del sangue continua, si può concludere che per l'applicazione di ogni sanguisuga ne vien sottratto all'ospite una quantità all'incirca doppia di quello che essa può contenere.

Oltre all'azione sottrattiva del sangue ed alla traumatica le Sanguisughe possono esercitare, durante il periodo del loro parassitismo temporaneo, una azione tossica, la quale è dovuta all'assorbimento di quelle secrezioni che il parassita versa nell'organismo durante il succhiamento e che, avendo una azione distruttiva sui corpuscoli rossi, possono determinare in alcuni casi delle gravi forme di anemia. Inoltre esse possono anche trasmettere malattie infettive specialmente quando, dopo aver succhiato sangue ad animali ammalati, vengono adoperate impropriamente per uso terapeutico determinando o malattie specifiche o disturbi infiammatori e nervosi più o meno gravi.

Le Sanguisughe italiane, più comuni e capaci di attaccarsi all'uomo sono due ed appartengono entrambe alla famiglia *Arhynchobdellidae* (*Gnatobdellidae*) (sanguisughe con mascelle).

Hirudo medicinalis (L.) Mignatta comune (fig. 339).

Lunga 8-15 cm., larga 1-2 cm.); generalmente ha il dorso grigio-olivastro con sei strie longitudinali rosse più o meno accentuate; bordi olivastri, ventre verde-oliva con macchie nere più o meno evidenti e orlato da una stria longitudinale nera; mascelle semicircolari con margine fornito da numerosi denti (50-100). Comprende numerose varietà di cui le più comuni sono quelle grigia e quella verde.

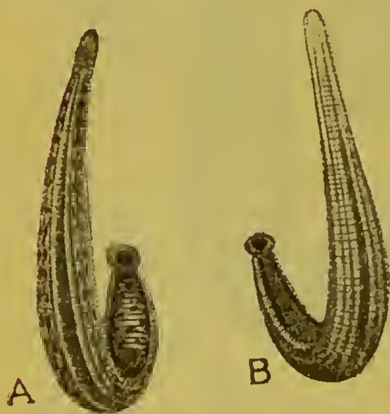


Fig. 339. — *Hirudo medicinalis*. A, varietà grigia; B, varietà verde (da Moquin-Tandon).

Vive nelle paludi ove è abbondante la vegetazione. La raccolta di esse vien fatta generalmente da uomini che, con estremità nude, si introducono negli stagni, paludi e ruscelli ove abbondano. Le Sanguisughe aderiscono facilmente alla pelle e, catturate con le mani prima che comincino a succhiare, sono rinchiuse in vasi a metà ripieni di acqua limpida o in recipienti che contengono dei piccoli blocchi di creta inumidita. Ivi si tengono fino a che non abbiano digerito completamente il sangue che eventualmente potevano aver succhiato ad altri animali. Si avrà una prova di ciò quando esse abbiano assunto una forma completamente appiattita. Prima di farle attaccare all'uomo è bene lavarle accuratamente e più volte con acqua bollita agitando con forza il recipiente che le contiene. Per applicarle sulla pelle occorre che questa sia ben pulita prima con alcool, poi, dopo averla ripetutamente lavata con acqua distillata in modo da togliere qualsiasi odore, asciugarla ben bene con cotone idrofilo. Allora, tolta la sanguisuga dal recipiente comune, si colloca dentro una provetta di cristallo ben tersa che abbia all'incirca la lunghezza del verme e una apertura di quasi due centimetri; questa si tiene aderente alla pelle fino a che non sia cominciato il succhiamento del sangue. Si applicheranno, seguendo lo stesso sistema, le altre Sanguisughe nel numero

che si crederà opportuno tenendo conto, come si è detto sopra, che ad ognuna di esse corrisponde una sottrazione di sangue all'incirca doppia di quello che possono contenere. La Sanguisuga sazia si stacca spontaneamente: allora è bene ucciderla recidendole la porzione anteriore. I punti di attacco, previa lavatura con acqua bollita vanno ricoperti con abbondante cotone sterilizzato. Se il gemizio di sangue si prolungasse più del necessario si può ricorrere a qualche emostatico, purchè risponda alle più scrupolose norme igieniche. Normalmente però è più che sufficiente una breve e leggera compressione. *Mai* e *per nessuna ragione* si deve ricorrere alle tele di ragno od altro rimedio popolare che esporrebbero il malato a pericoli non indifferenti.

Limnatis nilotica Savigny, 1820, *Haemopis sanguisuga* (Moq. Tandon, 1845). Sanguisuga cavallina (fig. 340 A).

Lunga 8-10 cm., larga 1-1,5 cm. Anteriormente è molto assottigliata, il suo corpo è sempre floscio e quando si stringe fra le dita sembra una Mignatta morta o malata. Il dorso è bruno grigiastro con quattro a sei file longitudinali di punti neri, piccoli, ravvicinati. Lateralmente una stria giallo-arancio o bruna. Ventre d'un colore unito più scuro che il dorso.



Fig. 340. — A, *Limnatis nilotica*; B, *Hirudo troctina* (da Moquin Tandon).

Le mascelle di questa Sanguisuga non sono così robuste come quelle della Mignatta medicinale. Si attacca quindi di preferenza sulle mucose facilmente accessibili e sopratutto a quella boccale.

Allo stato adulto vive di preferenza nelle acque melmose mentre nel periodo giovanile è abbondante nelle acque limpide e correnti specialmente durante la stagione estiva. Si riscontra quindi con facilità nei fontanili di campagna, nelle sorgenti, negli acquedotti, donde poi può giungere anche per le condotture dell'acqua potabile nell'interno delle abitazioni.

Data quindi la piccolezza sua quando è giovane (cm. 1.5 - 3 × mm. 2-3) può facilmente essere presa per un filo di erba, un detrito di paglia e così giungere inavvertita nella cavità boccale insieme alle acque.

Si fissa di preferenza sul frenulo linguale, sulla faccia interna delle labbra e delle guancie, sulle gengive, sul palato, sulle tonsille, sul faringe, laringe, e fosse nasali.

Fu anche riscontrata nel retto, nella vagina, nell'uretra e nella congiuntiva.

Essa si comporta diversamente dalla comune Mignatta che non si distacca se non quando è sazia. La Sanguisuga cavallina una volta giunta in un punto si fissa con la ventosa posteriore, mentre con l'anteriore cambia sovente di posto facendo continue e numerose ferite, che, per lo più, sono molto dolorose e lasciano sgorgare una discreta quantità di sangue.

Una volta assicurata la sua presenza per liberare il paziente non si deve ricorrere alla trazione brusca che può provocare una discreta emorragia, ma bisogna, dopo afferrata con una pinza a pressione continua la sanguisuga, fare con le forbici una larga incisione sul corpo in modo però da non tron-

carlo per metà. La Sanguisuga si staccherà allora spontaneamente e potrà essere rimossa senza pericoli. Se al contrario è lasciata a sè stessa o viene recisa di netto, specialmente se il suo punto d'impianto è il laringe, può cadere o tutta intera, o un frammento di essa nelle vie respiratorie, determinando accidenti svariati, non esclusa la soffocazione.

Ad impedire il parassitismo accidentale di questa Sanguisuga occorre: osservare bene l'acqua che si beve sopratutto in campagna; evitare sempre di bere le acque nei ruscelli o nelle fontane aspirandola direttamente con le labbra; adoperare invece sempre dei recipienti preferibilmente di cristallo, o anche meglio bere solamente le acque attraverso a filtri.

Oltre queste specie, comuni fra noi, possono riscontrarsi parassiti accidentali dell'uomo, altre Sanguisughe di cui le più comuni sono le seguenti:

Hirudo troctina Johns (fig. 340 B) che vive nell'Africa settentrionale e nella Sardegna ove si adopera come l'*H. medicinalis*;

Haemadipsa zeylanica (de Blainv.) propria del Ceylan, ove costituisce un vero flagello per l'uomo, al quale si attacca per succhiare il sangue attraversando anche i vestiti.

Tipo: ARTROPODI.

Gli Artropodi costituiscono un tipo animale ben caratterizzato. Essi infatti ci offrono una simmetria bilaterale ed il loro corpo è composto da una serie di segmenti o anelli più o meno differenziati che sono forniti di membra od appendici articolate. Hanno uno scheletro esterno di natura chitinosa.

In questo tipo si comprendono più classi delle quali tre sole ci possono interessare: i *Miriapodi*, gli *Aracnidi* e gli *Insetti*.

MIRIAPODI.

Volgarmente vengono chiamati *mille-piedi* e sono caratterizzati dall'avere il corpo costituito da un gran numero di segmenti tutti uguali fra loro, ad ognuno de' quali si articolano uno o due paia di zampe. È appunto sul numero delle zampe, che si rinvengono in ogni segmento che si basa la classificazione la quale comprende i seguenti due ordini:

Chilognati i quali hanno due paia di zampe per ogni segmento;

Chilopodi con un paio di zampe per ogni segmento.

Tanto il primo quanto il secondo ordine hanno delle specie che furono rinvenute accidentalmente nell'organismo umano tanto nelle fosse nasali quanto nel tubo digerente, ove giunsero sia direttamente, in ispecie durante il sonno, sia col tramite degli erbaggi o delle frutta ove generalmente vivono.

Nelle fosse nasali determinano dapprima una semplice irritazione della mucosa che si manifesta con senso di vellichio, prurito, starnuti; succede poi una reazione infiammatoria più o meno grave accompagnata da intense cefalee e qualche volta anche da fenomeni nervosi di origine riflessa.

Quando giungono nel tubo digerente vi restano generalmente poco tempo. I disturbi che producono sono per lo più di lieve entità e somigliano alquanto a quelli causati dalle elmintiasi.

Nell'un caso o nell'altro i fenomeni cessano con l'espulsione del miriapode, la quale si compie spontaneamente od anche in seguito agli starnuti, al soffiarsi del naso, in un accesso di tosse, oppure insieme al vomito od alle feci.

Le specie che fino ad ora si rinvennero nelle fosse nasali, secondo il Blanchard, appartengono ai generi *Geophilus*, *Choetechelyne* e *Lithobius*, quelle che vennero espulse dall'intestino si comprendono nei generi *Geophilus*, *Choetechelyne*, *Stigmatogaster*, *Himantarium*, *Polidesmus*, *Scutigera* e *Iulus*.

ARACNIDI.

Gli Aracnidi sono Artropodi a respirazione tracheale oppure cutanea. Il loro corpo è, nella maggior parte dei casi, diviso in due porzioni distinte: l'anteriore, *cefalotorace*, che risulta formata dalla fusione della testa e del torace e porta l'apparato boccale e quattro paia di zampe; la posteriore, *addome*, la quale spesso è articolata.

Gli Aracnidi si dividono in parecchi ordini ma due soli comprendono parassiti: le *Linguatule* e gli *Acari* che si differenziano per i seguenti principali caratteri:

Corpo	vermiforme, allungato, anellato; zampe mancanti nel periodo adulto	*Linguatulidae*
	corto, tozzo - quattro paia di zampe negli adulti . .	*Acaridae*

Ord. **Linguatule.**

Le *Linguatule* sono caratterizzate dall'avere il corpo vermiforme anellato, dall'essere sprovviste di zampe e dal presentare ai lati della bocca, che è ovalare ed inerme, due paia di uncini ricurvi, acuminati, semplici o doppi, i quali altro non sono che i rudimenti degli arti.

Per rispetto all'evoluzione si comportano come alcuni Vermi giacchè per il completo sviluppo è necessario che compiano delle migrazioni attraverso due ospiti diversi.

Nell'uomo furono rinvenute fino ad ora due sole specie parassite appartenenti ai due generi *Linguatula* e *Porocephalus* così fra loro distinti:

Corpo	depresso - faccia dorsale convessa a bordi denticolati - estremità anteriore più larga della posteriore, la quale è attenuata	*Linguatula*
	cilindroide con strozzamenti che lo rendono d'aspetto moniliforme	*Porocephalus*

Il genere *Linguatula* comprende una sola specie: la *L. serrata* Frölich (fig. 341) che allo stato adulto è abituale parassita nelle fosse nasali dei

carnivori (cane, lupo, volpe) ma che fu rinvenuta anche nei cavalli, nei muli e nella capra ed una volta anche nell'uomo.

Allo stato larvale invece si riscontra nei visceri e sopratutto nei gangli mesenterici, nel fegato, nei polmoni di molti altri mammiferi, ma in modo speciale nei ruminanti ed anche nell'uomo, il quale, come si vede, può albergare tanto l'uno come l'altro stadio.

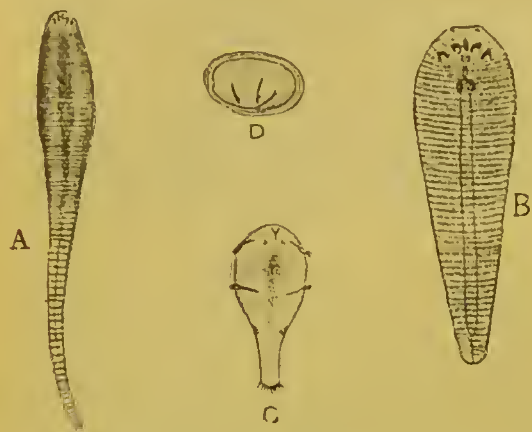


Fig. 341. — *Linguatula serrata*. A, femmina; B, larva; C, embrione; D, uovo embrionato (dal Railliet).

Il parassita adulto ha il corpo anceolato, depresso, con la parte anteriore assai larga e arrotondata, la posteriore allungata e ristretta; esso è composto di circa 90 segmenti assai distinti in guisa da farlo sembrare seghettato. La bocca è anteriore e ventrale. Da ciascun lato di essa si riscontrano due uncini acuminati biarticolati; l'articolo basale è assai assottigliato in quella porzione che si insinua profondamente nei tessuti.

Il maschio, bianco, è lungo circa due centimetri; la femmina, grigio-biancastra, con una stria bruna nella parte media quando è ripiena di uova, è lunga da 8 a 10 centimetri. Le uova sono ovoidi lunghe 90 μ e larghe 70.

La forma larvale misura 5-6 mm. di lunghezza, ha una forma di lingua allungata ed è interamente ricoperta di piccole ma robuste spinuzze, che sono distribuite regolarmente al margine posteriore di ciascun anello del corpo.

Le uova che già contengono l'embrione quando vengono emesse dalle femmine, si riscontrano in abbondanza nelle cavità nasali dei cani e vengono espulse con gli sternuti, provocati dal vellichio, che determina il parassita col muoversi. Rigettate sulle erbe vengono ingerite dagli erbivori e nello stomaco l'embrione viene messo in libertà: si presenta allora sotto l'aspetto di un Acaro con quattro zampe biungulate e con la parte posteriore affilata a guisa di coda, terminata da setole rade e corte. Alla parte anteriore invece esiste uno stiletto perforatore, impari. Con questo egli perfora la parete intestinale, che attraversa, per poi andare ad incistarsi nei gangli mesenterici, nei polmoni, nel fegato, ecc., ove, dopo aver subito più mute, termina il suo periodo larvale. Di queste larve molte ne sono destinate a perire nell'interno di questi organi, e solo poche, quelle cioè che riescono a pervenire all'esterno, sia perchè cadono nel lume dell'intestino, sia perchè penetrano nei bronchi, sia perchè vengono messe in libertà, colla morte dell'ospite, saranno capaci di compiere il loro ciclo evolutivo, passando nelle cavità nasali di un carnivoro, o direttamente, oppure risalendovi dal tubo digerente.

Una volta installate nel punto di elezione, che è precisamente lo spazio fra i cornetti e fra gli interstizi delle volute etmoidali raggiungono la fase adulta. Allora si accoppiano e, dopo avvenuta la fecondazione, i maschi vanno di luogo in luogo, girano per tutte le regioni delle cavità nasali e si spingono fino alla retrobocca e laringe, mentre le femmine si annidano nel cul di sacco del meato medio, dove, oltre al trovare più abbondante ali-

mento, sono al riparo delle correnti aeree respiratorie e quindi più tranquille nella loro funzione del parto.

Questo parassita, se allo stadio adulto, è capace di arrecare gravi lesioni meccaniche locali, che complicandosi possono condurre a morte i cani e gli altri mammiferi che l'ospitano abitualmente, allo stadio larvale sembra che sia assai bene sopportato tanto nel momento che perfora l'intestino per recarsi al luogo di elezione, come quando si localizza negli organi. La sua presenza più che da qualsiasi sintomo è accertata dalle autopsie. Sembra che nell'uomo sia più frequente di quanto si possa supporre: infatti Zenker la rinvenne a Dresda nel 4.69 % delle autopsie e Hans Laengner a Berlino nel 3 %.

La profilassi, dal momento che l'infestazione avviene con sicurezza ingerendo le uova che vengono a trovarsi sulle erbe, insudiciate dagli starnuti de' cani, consisterà nel ben lavare gli erbaggi o meglio nel non mangiarli che cotti.

Del genere *Porocephalus* fino ad ora due sole specie furono rinvenute parassite allo stato larvale nel fegato e nei polmoni nell'uomo: il *P. armillatus* Wyman ed il *P. moniliformis* Diesing, che adulte vivono nella trachea o nei polmoni de' grossi serpenti, come io stesso ho potuto rinvenire una volte in un *Python mulurus*. L'azione patogena determinata da questi parassiti può esser grave giacchè le larve, emigrando dal polmone, dal fegato o dalla milza possono determinare, oltre a dolori assai gravi, anche delle pneumoniti o peritoniti mortali.

Ord. **Acari.**

Gli acari sono animali di piccola mole senza divisione di segmenti (testa, torace, addome): hanno il corpo convesso superiormente, appiattito ventralmente. Il tegumento, liscio o finamente rugoso, è munito di setole, peli, aculei, spinule, ecc.

Le zampe sono corte, coniche, oppure lunghe; sempre in numero di 8, si distribuiscono per lo più in due gruppi, uno anteriore ed uno posteriore; l'ultimo articolo di esse porta un organo di fissazione: pelo, uncini, ventosa.

I pezzi boccali sono saldati e costituiscono un *rostro* per lo più situato in una insenatura della regione anteriore del corpo chiamata *camerostoma*.

Il rostro è costituito da una doccia ventrale formata dal labbro inferiore saldato alle mascelle (*hypostoma*). Questo nella concavità contiene due mandibole che per lo più terminano o con uncini o con pinze didattili (fig. 342).

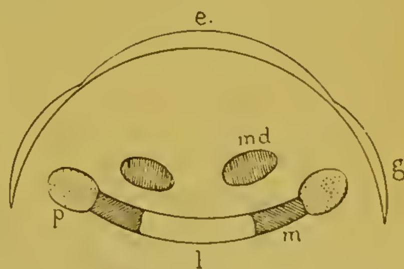


Fig. 342. — Sezione trasversale schematica del rostro di un Acaro: l, labbro inferiore; m, mascelle; p, palpi mascellari; md, mandibole; e, epistoma; g, guancie.

Ai lati della base del rostro trovansi i *palpi*, conformati diversamente, e qualche volta saldati ai lati dell'ipostoma.

Il camerostoma può prolungarsi in avanti formando superiormente l'*epistoma* e lateralmente le *guancie*.

Esistono glandole salivari.

I sessi sono distinti. Le femmine sono più grandi dei maschi e spesso vi è dimorfismo sessuale. In molte specie il liquido seminale, che si contiene in sacchetti speciali (*spermatofori*), viene introdotto nella vulva con l'aiuto del rostro.

Sono ovipari; dalle uova nascono larve esapodi che subiscono mute divenendo ninfe o larve ottopodi. Queste, con lo svilupparsi degli organi genitali, divengono maschi adulti e femmine puberi.

Queste ultime dopo l'accoppiamento divengono ovigere e presentano, oltre all'apertura vulvare, preanale e posteriore, una seconda apertura anteriore e ventrale, variabile per forma, che prende il nome di *tocostoma*.

Gli Acari si dividono zoologicamente in varie famiglie delle quali 6: *Demodecidae*, *Sarcoptidae*, *Bdellidae*, *Trombididae*, *Ixodidae* e *Gamasidae* hanno specie parassite.

Queste famiglie presentano ciascuna dei caratteri proprî che sono riassunti nella seguente:

Classificazione delle famiglie degli Acari
che possono vivere parassiti dell'uomo o pungerlo.

Corpo	allungato, vermiforme - mancanza di trachee - 4 paia di zampe - palpi uncinati - mandibole stiliformi . . .			*Demodecidae*
	corto, tozzo	senza trachee (*Astigmati*) palpi aderenti per la base al labbro, inermi - mandibole a pinza didattile		*Sarcoptidae*
		trachee che si aprono sulla parte anteriore del corpo - (*Prostigmati*) - palpi	liberi, inermi - mandibole a pinza . .	*Bdellidae*
			liberi, armati - mandibole ad uncino .	*Trombididae*
		trachee che si aprono nella parte posteriore del corpo - (*Metastigmati*) - palpi	liberi, filiformi o valvati - mandibole con una pseudo-pinza	*Ixodidae*
			liberi, filiformi - mandibole a pinza	*Gamasidae*

Fam. **Demodecidae.**

È rappresentata dal *Demodex folliculorum* var. *hominis* (Simon) (fig. 343). Ha un aspetto vermiforme con addome allungato e striato trasversalmente, il quale è diviso dalla porzione cefalo-toracica, convessa superiormente e piana inferiormente, mediante un solco superiore ben appariscente. Al cefalotorace si articolano quattro paia di zampe corte a tre articoli e terminate con due unghiette. Il rostro terminale è ben sviluppato e in esso possiamo notare come sia avvenuta la saldatura delle mascelle e delle mandibole e come i palpi, di quattro articoli, abbiano sull'ultimo un uncino rivolto in basso che serve di organo di presa e di aiuto nella deambulazione. L'ano è ventrale ed è situato nella porzione anteriore dell'addome: ha forma di una fessura

longitudinale, che è assai lunga nelle femmine. Queste hanno una lunghezza di circa 400 μ mentre i maschi non oltrepassano mai i 300 μ.

L'evoluzione dei *Demodex* fu studiata sopratutto sulla varietà propria al cane, nel quale, lungi dall'essere inoffensiva, produce una varietà di scabbia assai grave (la scabbia demodettica o rogna rossa). Le femmine dànno nascita ad uova piriformi dalle quali esce una larva apoda. Questa si trasforma

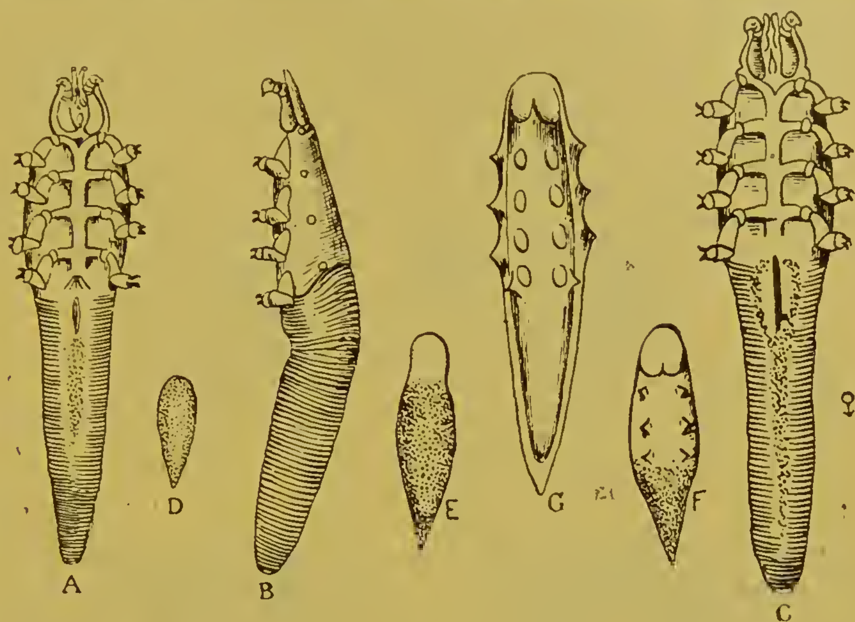


Fig. 343. — *Demodex folliculorum*. A, maschio dal lato ventrale; B, maschio di profilo; C, femmina dal lato ventrale; D, uovo; E, embrione; F, larva esapode; G, ninfa ottopode (dal Megnin).

in larva esapode che non tarda a divenire ninfa ottopode. Dopo due mute queste ninfe giungono allo stadio adulto.

Questi Acari sono frequenti in tutte le età ed abitano nelle glandole sebacee specialmente in quelle delle pinne nasali, delle labbra, delle guancie, della fronte. Sembra non esercitano alcuna azione patogena; tutt'al più, quando il numero dei *Demodex* nella stessa glandola è considerevole, può determinarsi la formazione di un comedone. La sua frequenza negli individui affetti da acne ha fatto pensare che questa fosse dovuta esclusivamente all'Acaro, mentre invece si è constatato che si tratta di una pura coincidenza.

In questi ultimi tempi il Borrel, avendo osservato con una certa frequenza dei *Demodex* in vari epiteliomi, suppone che essi possano avere una certa importanza nello sviluppo di questi, sia per l'irritazione locale che possono determinare, sia anche come trasportatori di *virus*. Il medesimo autore poi, avendo rinvenuto nei leprosi alcuni *Demodex* coperti di bacilli della lebra, suppone che possano avere anche una certa importanza nella trasmissione di questa malattia.

Fam. Sarcoptidae.

Gli Acari compresi in questa famiglia sono assai numerosi: hanno il corpo tozzo, molle, biancastro o rossastro, la cui grandezza va da $^1/_{10}$ ad un millimetro. Sono ovipari o vivipari: hanno metamorfosi complicate e spesso ci

presentano dimorfismo sessuale. Molte sono le sotto-famiglie che si comprendono in questa famiglia, molti generi della quale vivono da veri parassiti, altri come semplici commensali e moltissimi si nutrono di sostanze organiche in decomposizione.

Sono privi di occhi e di apparato respiratorio; il rostro presenta le mandibole terminate con una pinza didattile. Le zampe, disposte in due gruppi, le une anteriori vicino al rostro, le altre posteriori, sono composte da cinque articoli l'ultimo de' quali termina con uno o due uncinetti accompagnati generalmente da una piccola ventosa peduncolata od anche da lunghe e robuste setole. Il loro accrescimento avviene per mute successive, le quali potrebbero più propriamente chiamarsi metamorfosi, giacchè ognuna di esse è accompagnata da un processo di istolisi durante la quale gli organi tornano a formarsi.

In questa famiglia troviamo parassiti dell'uomo nelle due sotto-famiglie *Sarcoptinae* e *Tyroglyphinae* differenziate dai seguenti caratteri:

Corpo a tegumento	striato simmetricamente - le due paia di zampe posteriori, oppure un sol paio di esse, per lo più diverse dalle anteriori	*Sarcoptinae*
	liscio - zampe tutte ugualmente sviluppate negli adulti	*Tyroglyphinae*

Sotto-fam. *Sarcoptinae*. È nella sotto-famiglia *Sarcoptinae* che si comprendono gli Acari capaci di dare le vere *scabbie* tanto nell'uomo come negli animali, ed i tre generi, che in essa vengono collocati, si distinguono fra loro sia per la sede che occupano nell'ospite, sia per le lesioni che gli arrecano, sia anche per i seguenti caratteri anatomici:

Zampe	posteriori nascoste quasi interamente sotto l'addome - rostro corto e largo - ventose ambulacrali peduncolate - peduncolo semplice, lungo - ♂ senza ventose copulatrici nè lobi addominali		*Sarcoptes*
	del 3° paio e qualche volta del 4° che sporgono fuori dell'addome - ♂ con lobi e ventose copulatrici all'estremità dell'addome - rostro	lungo, acuto - ventose ambulacrali con peduncolo lungo, triarticolato . .	*Psoroptes*
		lungo, ottuso - ventose ambulacrali con peduncolo semplice, corto .	*Chorioptes*

Il *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* (Lin.), è senza dubbio l'Acaro conosciuto da più tempo, così che Avenzoar (1072-1161) ne fa la prima menzione. Più tardi se ne trova notizia nella *Physica Sancti Hildegardis* (1200) ove si chiama *suren*, ed in seguito ne dànno cenni diversi il Monfet (1634), il Paré (1664), l'Hauptmann (1657), il Wedel (1672) e l'Ettmüller.

Ma fu senza dubbio il Redi (1687) quegli che non solo dette una esatta descrizione dell'Acaro, ma che stabilì come esso fosse la sola causa della scabbia, la quale, secondo quanto egli dice, diveniva contagiosa per il passaggio del parassita da un individuo malato ad uno sano, e poteva guarire solo con l'applicazione esterna di sostanze acaricide, mentre che inutili si rendevano tutti i rimedi che per la via interna venivano somministrati.

Malgrado ciò e malgrado le osservazioni di altri autori, che numerosi si seguirono da quell'epoca in poi, la natura parassitaria della scabbia fu messa in dubbio da molti e fu solamente accettata in modo assoluto quando nel 1834 lo studente côrso Renucci dimostrò che questa malattia guariva con l'estrazione del parassita.

L'Acaro della scabbia (fig. 344) ha il corpo ovalare, di colorito grigio-madreperlaceo nella femmina, globoso e rossastro nel maschio. Si vedono numerose strie parallele percorrere tutta la sua superficie ad eccezione di una specie di piastrone dorsale, il quale è scabroso e munito di rialzi triangolari acuti

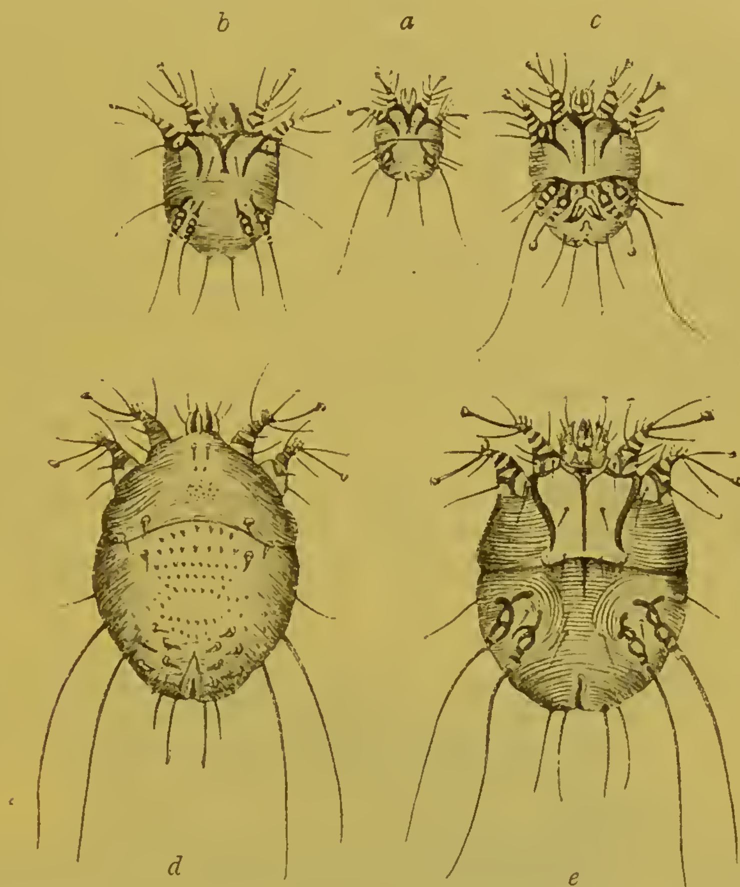


Fig. 344. — *Sarcoptes scabiei*: *a*, larva esapode; *b*, ninfa ottopode; *c*, maschio; *d*, femmina dal lato dorsale; *e*, femmina dal lato ventrale.

(scaglie dorsali) che si estendono fino ai fianchi; notansi inoltre in corrispondenza del solco che separa il cefalo-torace dall'addome tre spine corte, rigide e fusiformi, e nell'addome numerose spine (sette per lato) anch'esse robuste, diritte, disposte in due serie. Ano al bordo posteriore della faccia dorsale. Il maschio è molto più piccolo della femmina. Esso misura 200-400 μ di lunghezza e 145 190 μ di larghezza. Ci presenta un organo copulatore in mezzo al quarto paio di zampe, e questo nell'ultimo articolo, è fornito di una ventosa in luogo di una setola come si osserva nella femmina. Questa è lunga fino a 450 μ e larga dai 250 ai 350. È ovipara e le uova, le quali al momento del parto misurano 150 $\mu \times 100\ \mu$, vengono deposte dentro le gallerie: sono ovoidi a contenuto granuloso e non è raro riscontrarne alcune con

entro l'embrione già formato. Quanto duri la incubazione delle uova, ancora non è bene conosciuto, ma certo dura pochissimi giorni, 7 od 8. La larva che esce dall'uovo, perfora la volta della galleria e viene alla superficie della pelle, dove vive in libertà: somiglia molto ai *Sarcoptes* adulti, ma non presenta gli organi genitali ed è provvista solo di tre paia di zampe (*larva esapode*).

Dopo due o tre mute, in ciascuna delle quali avviene un completo rammollimento di tutti gli organi interni, la larva, circa al 16° giorno, si trasforma in ninfa che ha le quattro paia di zampe come gli adulti (*ninfa ottopode*). Al 21° giorno subisce un'altra muta ed al 28°, dopo una nuova muta, si trasforma od in maschio oppure in femmina pubere. Questo periodo costituisce il massimo grado di sviluppo per i maschi, i quali cercano allora le giovani femmine e con esse si accoppiano. Avvenuta la copula queste subiscono ancora una muta; la loro mole si accresce e noi vediamo comparire ventralmente la fessura trasversale che costituisce l'apertura destinata al parto (*tocostoma*), e che serve di orifizio esterno all'ovidutto, mentre la fecondazione avvenne per un'altra apertura (*vulva*) situata al disopra di quella anale. Dal *tocostoma* vengono fuori le uova, le quali sono espulse dalle femmine non alla superficie del corpo, ma nello spessore dell'epidermide, nei *cunicoli*, impropriamente denominati solchi.

Per far questi la femmina solleva con le mandibole le lamelle epidermiche, lede la continuità della cute e facendo puntello delle sue zampe posteriori, con movimenti laterali si infossa sotto di essa e procede sempre all'innanzi senza poter più retrocedere a causa delle spine che trovansi sul suo dorso. Lungo il cammino, oltre gli escrementi, che si presentano come punti neri, deposita man mano le uova che non tardano a schiudersi



Fig. 345. — Galleria di *Sarcoptes scabiei*.

e mettere in libertà le larve, le quali poi compiono il loro sviluppo alla superficie del corpo oppure sotto le croste che vengono a formarsi nel corso della malattia (fig. 345).

La fecondità delle femmine è straordinaria, e dai calcoli fatti, specialmente dal Gerlack, si può ritenere come una sola coppia di Acari possa, in tre mesi circa, dar luogo a sei generazioni, che costituiscono un insieme di un milione di femmine e circa 500.000 maschi.

I *Sarcoptes* sono cosmopoliti e, come negli animali, così anche nell'uomo hanno delle sedi di predilezione. Infatti noi vediamo che le regioni preferite per ordine di frequenza sono le seguenti: gli spazi interdigitali, il polso,

l'avambraccio, la faccia anteriore delle ascelle, le natiche, i genitali maschili, il petto e principalmente intorno alla areola mammaria nelle donne.

La scabbia si contrae per il passaggio sulla pelle d'un individuo sano di una giovane femmina appena fecondata oppure di una femmina pubere e di un maschio. Avendo questi Acari abitudini notturne il contagio avviene per lo più durante la coabitazione notturna: ciò non toglie però che essa possa contrarsi anche dormendo nel letto ove aveva riposato uno scabbioso.

È più frequente nell'inverno. Non risparmia nessuna condizione sociale, ma è più facile riscontrarsi negli individui sudici e si sviluppa di preferenza là dove esistono agglomerazioni di persone.

La diagnosi si fonda sul prurito notturno, sul polimorfismo delle lesioni secondarie, ma sopratutto sulla constatazione delle gallerie che si presentano assai variabili per forma e per lunghezza. Questa va dai 5 ai 20 millimetri, quella può essere diritta, a ferro di cavallo o tortuosa.

In ogni galleria, osservata con la lente, si nota che le due estremità sono diverse fra di loro, e mentre quella d'ingresso è larga e di colorito nerastro, il fondo cieco invece è saliente, papuloso, biancastro, per la presenza in esso dell'Acaro. Ed è qui che questo deve essere ricercato; lacerando questa eminenza bianco-perlacea con un ago e mettendo a nudo il cunicolo è facile prendere il parassita sulla punta dell'ago stesso o di una spatola. Un occhio esperto anche senza lente può constatarne la cattura e con facilità seguirne i movimenti.

Oltre il *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* tutte o quasi tutte le altre varietà proprie agli animali domestici possono eccezionalmente osservarsi sull'uomo il quale, a seconda delle diverse abitudini, può essere attaccato da una forma piuttosto che da un'altra; così coloro i quali sono costretti ad avvicinare i cavalli contraggono con facilità il *S. scabiei* var. *equi*, nei pastori si rinviene la var. *ovis* e *caprae;* nei guardiani di maiali la var. *suis*. Ma nessuna varietà animale può rimanere a lungo nell'uomo e determinarvi una vera e propria scabbia; il cunicolo generalmente manca, sebbene le lesioni polimorfe possano raggiungere una certa entità.

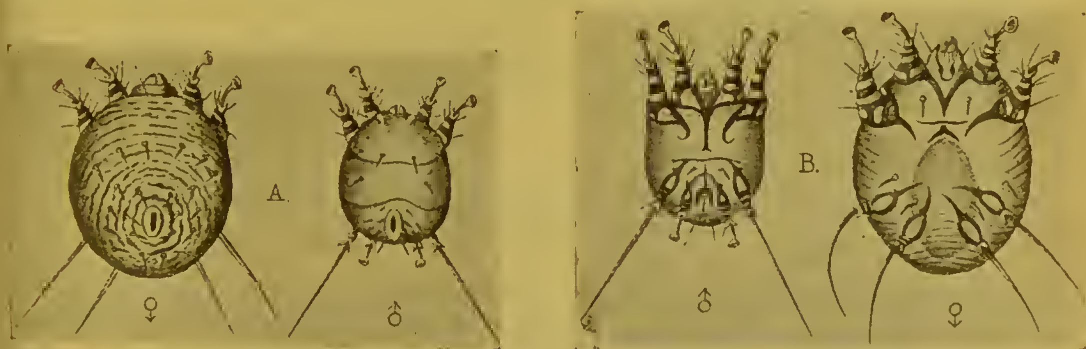


Fig. 346. — *Sarcoptes minor*. Maschio e femmina. A, dal lato dorsale; B, dal lato ventrale (Orig.).

Lo stesso può dirsi del *Sarcoptes minor* Furst. (fig. 346) che vive abitualmente nei gatti e che diversifica dal *S. scabiei* perchè più piccolo e perchè ha la faccia dorsale guarnita di spine e di scaglie smusse situate attorno all'ano che è dorsale. Esso può comunicarsi facilmente all'uomo, ma la scabbia

che determina non ha tendenza ad estendersi e sparisce in pochi giorni, dieci, venti al più.

Nello stesso modo si comportano il *Psoroptes communis* (Furst.) (fig. 347) ed il *Chorioptes symbiotes* (Verheyen). Il primo infatti è comune nei cavalli, nei buoi e nei maiali in cui determina la *scabbia psoroptica*; nei conigli poi, nei quali si localizza al condotto uditivo esterno, produce una grave malattia giacchè, la loro presenza spesso è accompagnata da otiti assai gravi che

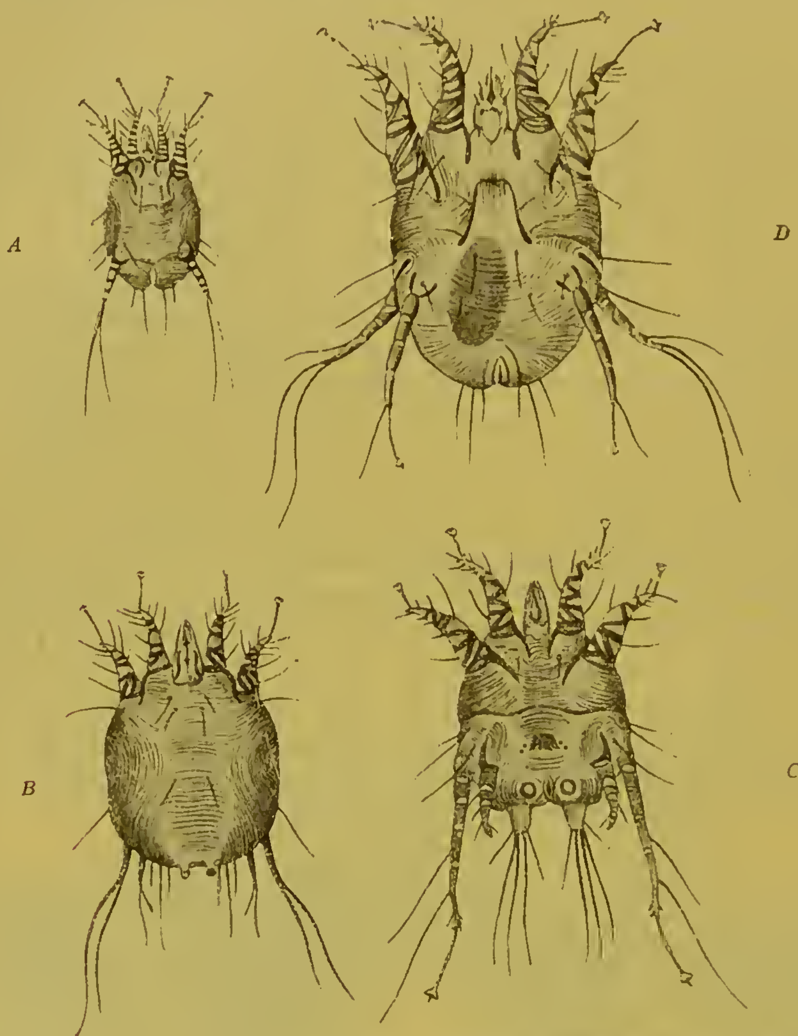


Fig. 347. — *Psoroptes communis*. *A*, larva esapode; *B*, ninfa ottopode; *C*, maschio; *D*, femmina ovigera (dal Railliet).

possono anche condurre a morte gli animali. Solo accidentalmente fu trovato sull'uomo nel quale determina un prurito violento e nulla più, senza cagionare una vera e propria forma scabbiosa.

Il *Chorioptes* (fig. 348) che negli animali produce la cosidetta *scabbia simbiotica, dermatofagica, scabbia delle zampe dei cavalli*, ecc., fu rinvenuto eccezionalmente nell'uomo, sia sotto croste cutanee, sia anche nei follicoli sebacei del naso.

Una varietà invece del *Sarcoptes* che si comporta diversamente dalle altre è quella che il Fürstenberg chiamò var. *crustosae* la quale sembra de-

termini quella forma clinica speciale che va col nome di *scabbia norvegese* o *crostosa*, caratterizzata dallo sviluppo di croste giganti sotto le quali pullulano gli Acari.

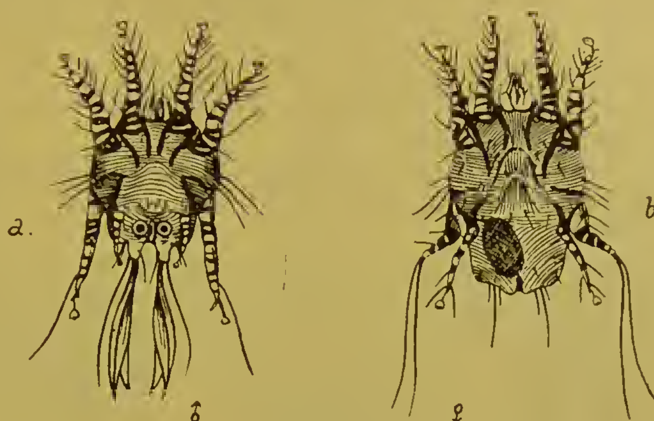


Fig. 348. — *Chorioptes symbiotes*: *a*, maschio; *b*, femmina.

Sotto-fam. *Tyroglyphinae*.

I rappresentanti di questa sottofamiglia sono tutti Acari detriticoli che allo stato adulto vivono in libertà e si nutrono di sostanze organiche specialmente di quelle in decomposizione: formaggio, farina, zucchero, frutta secche, funghi, conserve alimentari, ecc., pungono però assai frequentemente l'uomo nel quale determinano eruzioni cutanee più o meno gravi. Inoltre, vivendo sulle derrate alimentari, una volta ingoiati, possono esser causa di lesioni nell'intestino, le quali si manifestano sopratutto sotto forma di catarri intestinali.

Sono Acari piccolissimi privi di occhi e di trachee: hanno la cute liscia, le zampe sono tutte presso a poco uguali fra di loro, sporgono tutti dai margini del corpo e terminano con un artiglio e con dischi adesivi. Nei maschi si rinvengono ventose copulatrici ai lati dell'ano.

I generi che ci interessano possono distinguersi per i seguenti caratteri:

Peli del corpo	semplici, lisci - presenza di solco fra il cefalo-torace e l'addome - tarsi	con caruncole.	*Tyroglyphus*
		senza caruncole — ♂ con appendici fogliacee all'estremo dell'addome.	*Histiogaster*
		senza caruncole — ♂ senza appendici fogliacee all'addome . .	*Rhyzoglyphus*
	con barbule - assenza di solco fra il cefalo-torace e l'addome		*Glycyphagus*

Il gen. *Tyroglyphus* Latr. comprende due sole specie che possono causare disturbi nell'uomo: il *T. farinae* De Geer ed il *T. siro* L.

Il *Tyroglyphus farinae* (De Geer) piccolo Acaro di forma ovale, che raggiunge appena nei maschi i 330 μ e nelle femmine ovigere i 600 μ:

ha il corpo guarnito di scarse setole, con il rostro e le zampe di un colorito rossastro chiaro: il primo paio di queste è nel maschio più sviluppato delle altre, specialmente a livello del secondo articolo, che è armato di uno sperone molto robusto. Vive sulle sostanze organiche in decomposizione, specialmente sul formaggio guasto, ove scava delle vere e numerose gallerie. Nei magazzini di grano è anche assai frequente, ed attacca gli operai che lo manipolano producendo loro una eruzione cutanea, accompagnata da intenso prurito che può durare più giorni.

Il *T. siro* L. (fig. 349), poco più piccolo del precedente, ha un colorito biancastro o leggermente roseo. Vive anche esso sui vecchi formaggi, sulle

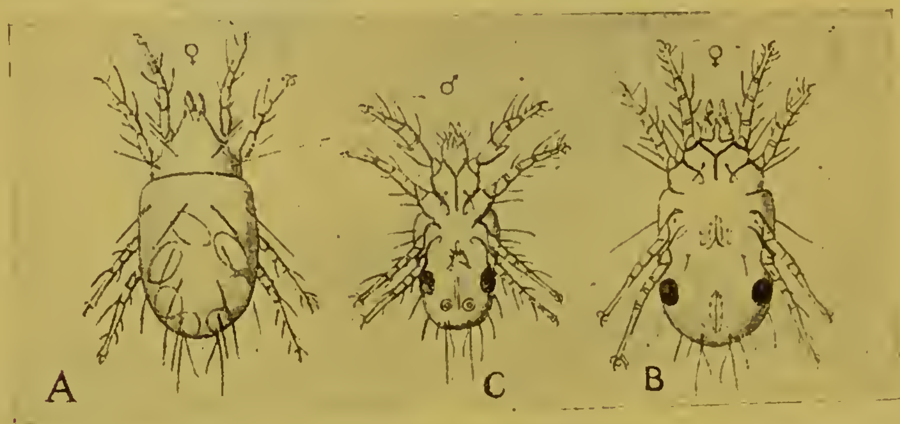


Fig. 349. — *Tyroglyphus siro*. A, femmina dal lato dorsale; B, dal lato ventrale; C, maschio (dal Mégnin).

farine e sulle corteccie della vainiglia, nei lavoratori della quale produce una caratteristica eruzione che può durare parecchi giorni, e che si manifesta con un fortissimo prurito e con una eruzione papulosa, alle volte accompagnata da blefarite e corizza. Questi accidenti costituiscono il cosidetto « *vainiglismo professionale* » da non confondersi con le forme nervose cui van soggetti gli operai nei magazzini ove si lavora la vainiglia, le quali sembra siano prodotte da una intossicazione speciale dovuta alle emanazioni di essa.

Lesioni simili a quelle prodotte da questa specie sembra che sia capace di determinare anche nei lavoratori della vainiglia l'*Histiogaster entomophagus* (Loboulbène), mentre che il *Rhizoglyphus parasiticus* Dalgetty, sembra che sia la causa di una eruzione tipica e comune nei piantatori di the, la quale comincia con bollicine fra le dita dei piedi e poco a poco si estende fino alla regione malleolare.

Il *Glyciphagus domesticus* (De Geer) vive di preferenza nelle frutta secche e nelle sostanze zuccherine (canditi, ecc.). È assai frequente e sembra che esso sia capace di determinare quella irritazione passeggiera, ma assai violenta, che spesso si riscontra nei manipolatori di zucchero e che va col nome di scabbia dei droghieri (*grocer's itch*).

Fam. **Bdellidae**.

A questa famiglia *Bdellidae* appartiene un sol parassita accidentale dell'uomo, il *Tydeus molestus* Moniez, che è una specie cieca, di tinta rosa. Il maschio lungo mm. 0.2 è molto raro: la femmina pubere è di circa mm. 0.250,

mentre la gravida raggiunge mm. 0.360. Fu trovato la prima volta dal Moniez in Belgio nel 1864. Esso assale l'uomo nei prati e nei giardini durante l'estate, e colla sua puntura insopportabile, provoca dei pomfi dolorosissimi, le traccie de' quali durano cinque o sei giorni.

Fam. **Trombididae.**

Comprende alcuni Acari dalla cute sottile, spesso con colori vivaci, a respirazione tracheale ed occhi peduncolati. Le mandibole sono uncinate o terminano con una punta ed hanno l'ultimo articolo delle zampe con dischi adesivi fra gli artigli. Sebbene si comprendano in questa famiglia numerosi generi, noi ne considereremo solamente quattro, come quelli che sono più comuni. Essi presentano i seguenti caratteri zoologici:

Mandibole	terminanti con un uncino - palpi robusti - 4° articolo con artiglio; il 2° più grande degli altri - zampe con 6 articoli			*Trombidium*
	stiliformi terminanti con una punta - palpi	piccoli, semplici, poco distinti - zampe di 5 articoli - appendice claviforme fra il 1° e 2° paio - Dimorfismo sessuale		*Pediculoides*
		robusti - 4° articolo con forte artiglio - zampe	di 5 articoli.	*Cheyletus*
			di 6 articoli.	*Tetranychus*

Il gen. *Trombidium* Latr. comprende come parassita dell'uomo solamente le forme larvali di alcune specie: tra queste le più note sono:

il *T. akamushi* Brumpt, volgarmente chiamato *Kedani*, il quale sembra che determini la così detta febbre di fiume o di inondazione alle volte mortale fra i lavoratori della canape in Giappone;

il *T. tlalsahuate* Brumpt, che, sopratutto nel Messico, attacca l'uomo fissandosi nelle palpebre, nel cavo ascellare, nel prepuzio, nell'ombellico producendo prurito, gonfiore e spesso anche suppurazione;

il *T. holosericeum* (Lin.) (fig. 350), che vive fra noi. Gli adulti vivono liberi e si nutrono di succhi vegetali. la forma larvale invece, il *Leptus autumnalis* (Shaw) si rinviene verso la fine dell'estate nei luoghi erbosi, sui cereali, sugli arbusti, ecc. ed assale spesso anche l'uomo, salendo su per le gambe e fermandosi sopratutto là dove le legature impediscono il suo progredire. Qui infossa il suo rostro nella pelle determinando quella forma morbosa che va col nome di *eritema autunnale*, caratterizzato dall'intollerabile prurito simile a quello della scabbia e dalla tumefazione della pelle, la quale diviene dapprima rossa o violacea, poscia si ricopre di numerose papule. Il grattamento fino a sangue aumenta la infiammazione; molte volte insorge



Fig. 350. — *Trombidium holosericeum*. A. Femmina adulta; B, larva (dal Megnin).

una febbre più o meno intensa, specialmente quando grande è il numero dei parassiti e gravi sono le lesioni da essi prodotte.

Però siccome questi parassiti restano pochi giorni fissati alla pelle dell'uomo, giacchè la larva, divenuta ottopode, ha le stesse abitudini degli adulti, i disturbi da essi prodotti sono assai fastidiosi, ma per lo più non sono gravi.

Pediculoides ventricosus (Newport).

Questo strano Acaro, abitualmente vive parassita delle larve o delle ninfe di molti insetti e sopratutto della Tignuola del grano. Può assalire anche l'uomo. Vari casi di parassitismo furono registrati nella letteratura ed io stesso due anni or sono ho potuto osservare parecchi scaricatori di grano tormentati dalle punture di questi Acari a tal punto da rifiutarsi assolutamente al lavoro. Accusavano tutti un prurito insopportabile alle spalle, al petto, alle braccia, alla faccia, attorno al collo. La loro pelle presentava qua e là dei grossi pomfi confluenti di colorito rosso vivo, i quali facevano contrasto col colore bianco della cute normale.

I disturbi sono generalmente tutti di breve durata, e solo qualche caso più grave può essere accompagnato da leggera reazione febbrile. Nel caso da me constatato il numero dei *Pediculoides* era tale e tanto da formare uno strato di circa un dito di spessore nell'interno del vagone che conteneva il grano. I sacchi erano lateralmente coperti da una specie di polvere rosso-ruggine rappresentata esclusivamente dagli innumerevoli parassiti.

Questi ci presentano un dimorfismo sessuale spiccatissimo (fig. 351). I maschi hanno un corpo ovalare, angoloso, con robuste setole sulla faccia dorsale che posteriormente ci offre una specie di piastrone alquanto scabroso.



Fig. 351. — *Pediculoides ventricosus*. B. maschio; C, femmina non gravida; D, femmina gravida (da Laboulbène et Mégnin).

La femmina, se non è gravida, è cilindroide con le otto zampe disposte in due serie, quattro anteriori e quattro posteriori; se invece è gravida lo addome si rigonfia e sembra che l'Acaro porti con sè una grossa sfera attaccata alla parte posteriore del corpo. Questo rigonfiamento contiene gli embrioni, i quali ivi compiono il loro sviluppo, di guisa che quando nascono hanno già gli organi genitali e sono atti alla fecondazione.

Come parassiti puramente accidentali furono inoltre segnalati per l'uomo il *Cheyletus eruditus* (Schrank) che vive abitualmente nei vecchi libri, ed i

Tetranychus molestissimus Weyenberg e *T. telarius* Lin. i quali, pur potendo pungere l'uomo, abitualmente vivono sulle piante.

Fam. **Ixodidae.**

Gli Ixodidi o Zecche sono Acari abbastanza grandi i quali ci presentano una cute coriacea facilmente distensibile, alla quale si articolano direttamente le zampe. Il corpo è appiattito se sono digiuni, globoso quando sono sazi. Il rostro, col quale si attaccano all'ospite per suggere il sangue, è formato da un dardo munito di denti rivolti all'indietro.

Le mandibole a bastoncello portano all'estremità anteriore un articolo terminale più o meno dentellato e piegato ad uncino a guisa di arpione.

Ai lati del rostro si trovano i palpi per lo più a forma di doccia; in questo caso servono come di astuccio al rostro stesso e lo nascondono.

La faccia dorsale (fig. 352) ci presenta *lo scudo*, che è piccolo e ridotto solo alla porzione anteriore nella femmina, mentre che nel maschio è grande

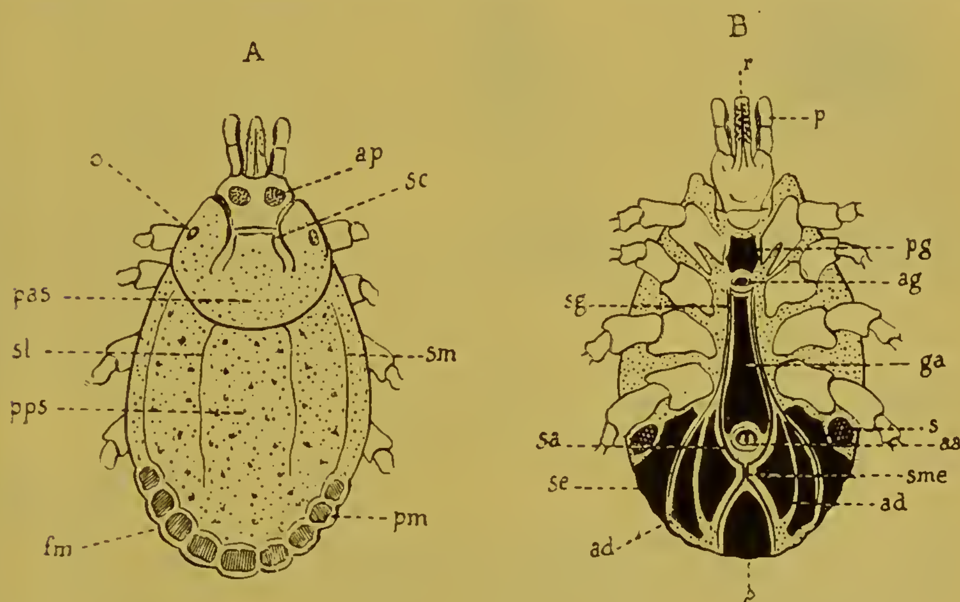


Fig. 352. — Schema dell'organizzazione esterna di un Ixodide. A, lato dorsale; B, lato ventrale.

e qualche volta assai nettamente diviso in una porzione anteriore (pas) ed in una posteriore (pps). Lo scudo anteriormente porta una insenatura nella quale si colloca la testa. Dagli angoli di questa insenatura partono i *solchi cervicali* (sc) che, divergendo, si prolungano indietro. Sul dorso anche, specialmente nella femmina, si notano i *solchi longitudinali* (sl) e qualche volta dei *solchi marginali* (sm), i quali limitano la parte posteriore dello scudo ove si osservano delle *punteggiature*, delle *cripte* delle *fossette*. Negli Ixodini esistono sul bordo posteriore dei *festoni marginali* (fm) che limitano altrettante *placche marginali* (pm). Qualche volta esistono *occhi* (o) che occupano i bordi latero-dorsali della porzione anteriore dello scudo, come pure possono riscontrarsi degli organi particolari consistenti in due fossette simmetriche, situate dietro la testa, che prendono il nome di *aree porose* (ap), le quali, riunendosi sulla linea mediana, possono anche fondersi in una sola.

Nella faccia ventrale dobbiamo notare due aperture: la *genitale* (ag) che è anteriore e la *anale* (aa) posteriore. Dalla prima si dipartono i *solchi genitali* (sg); attorno alla seconda esiste un *solco anale* (sa) che contorna l'ano ed uno *solco mediano* od *ano-marginale* (sme) che qualche volta biforcandosi giunge fino al bordo posteriore.

Nei maschi possiamo anche osservare degli ispessimenti della chitina, *scudi*, i quali in numero variabile, a seconda della loro posizione, possono assumere il nome di scudi: *progenitale* (pg), se si trova innanzi all'apertura genitale, *genito-anale* (ga) se è fra questa e l'ano, *anale* (a) se è situato fra l'ano e il margine posteriore, *adanali* (ad) se sono ai lati dell'ano ed *epimerali* (se) quando si trovano ai lati del corpo dietro agli *stigmi* (s).

Le zampe alla loro estremità (fig. 353) sono munite di artigli od unghie e possono o no avere degli *ambulacri* o *pulvilli*.

Fig. 353. — Zampa d'Ixodide. A, dal lato dorsale: B, dal lato ventrale; a, ambulacri; u, unghie.

L'apparato respiratorio costituito da numerose trachee si apre all'esterno su due *stigmi*, situati ai lati del corpo dietro al quarto paio di zampe.

La femmina, una volta sazia, si stacca spontaneamente dall'ospite e comincia a depositare le uova, delle quali il numero è variabile secondo le specie, ma sempre assai numerose; da un minimo di 1000 ad un massimo di circa 12,000.

Il parto può durare a lungo, qualche volta più di 30 giorni: durante questo tempo la femmina non si nutre ma digerisce e consuma tutto il cibo accumulato ne' ciechi intestinali. Con l'ultimo uovo deposto essa muore. Dall'uovo, in un periodo più o meno lungo a seconda cioè dell'epoca della deposizione (più presto in estate, più tardi in autunno) nasce una *larva esapode* che si arrampica tosto sulle erbe, attendendo che un ospite adatto (piccolo mammifero, uccello, rettile) giunga alla sua portata per aggredirlo e nutrirsi del suo sangue; quando è sazia subisce una muta e si trasforma in *ninfa ottopode* la quale, dopo aver subito delle mute, come la larva, assalisce i piccoli mammiferi nutrendosi del loro sangue: poi, sempre in seguito ad altre mute, diviene Acaro adulto.

Numerosissimi sono gli Ixodidi che possono assalire l'uomo o gli animali per succhiarne il sangue e che sono capaci di trasmettere quelle malattie da Protozoi che vanno col nome di *Babesiosi* e *Spirochetosi* (vedi *Protozoologia*).

È ben raro però il caso che una specie sia esclusiva ad un ospite; per lo più una stessa specie può attaccare animali di natura diversa. Infatti il quadro seguente ci può dare una idea di quanto avviene per le specie italiane più comuni:

TABELLA 98.

Parassita	Ospite								
	Uomo	Cane	Gatto	Cavallo	Maiale	Pecora	Buoi	Capra	Lepre Coniglio
Ixodes ricinus	+	+	+	+	—	+	+	+	+
» *hexagonus* . .	+	+	+	—	—	+	+	—	+
Hyalomma aegyptium	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Rhipicephalus sanguineus	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Rhipicephalus bursa .	—	+	—	+	+	+	+	+	—
Margaropus (Boophilus) annulatus	—	+	—	+	—	+	+	—	—
Dermacentor reticulatus	+	+	—	+	+	+	+	+	—
Haemaphysalis punctata	—	+	—	+	—	+	+	+	+
Argas reflexus	+	—	—	+	—	—	—	—	—

Il segno + indica che l'uomo o gli animali possono essere attaccati dal parassita: il segno — che non lo sono.

Gli Ixodidi si dividono in due sottofamiglie, ambedue importanti, perchè contengono generi e specie capaci di trasmettere malattie. La divisione è fondata sui seguenti caratteri:

Rostro
- anteriore, terminale - scudo dorsale - ambulacri ai tarsi. *Ixodinae*
- inferiore - senza scudo dorsale - non ambulacri ai tarsi. *Argasinae*

Sotto-fam. *Ixodinae*. La sotto-famiglia *Ixodinae* alla sua volta deve essere divisa in più sezioni come segue:

Solco anale ne' ♂
- che circonda l'ano in avanti, indipendentemente dai solchi genitali - superficie ventrale ricoperta da scudi - non occhi - rostro lungo . . . . *Ixodeae*
- che circonda l'ano posteriormente e raggiunge spesso in avanti i solchi genitali
  - superficie ventrale con due scudi adanali con o senza scudi accessori nei maschi - occhi presenti - rostro variabile . *Rhipicephaleae*
  - superficie ventrale senza scudi adanali nei maschi - spesso occhi - rostro variabile . . *Amblyommeae*

Alla sezione delle *Ixodeae* appartengono le due specie del gen: *Ixodes* Latr.: l'*I. hexagonus* Leach e l'*I. ricinus* (Lin.) (fig. 354).

Sono assai somiglianti fra loro e si differenziano sopratutto per i:

Tarsi
- corti e rigonfi all'estremità . . . . *I. hexagonus*
- non rigonfi all'estremità. . . . . *I. ricinus*

Sono specie assai comuni fra noi. Attaccano quasi tutti i mammiferi domestici e spesso anche l'uomo, sopratutto i cacciatori e i legnaiuoli.

Non è raro però il caso che possano attaccare anche altre persone, sopratutto quelle che, durante i calori estivi, si trattengono a lungo all'ombra degli alberi in aperta campagna. Io stesso ho potuto osservare più di un caso di parassitismo nell'uomo dovuto tanto all'una come all'altra specie. Alle volte la puntura, che questi Ixodidi producono, passa inosservata; ma

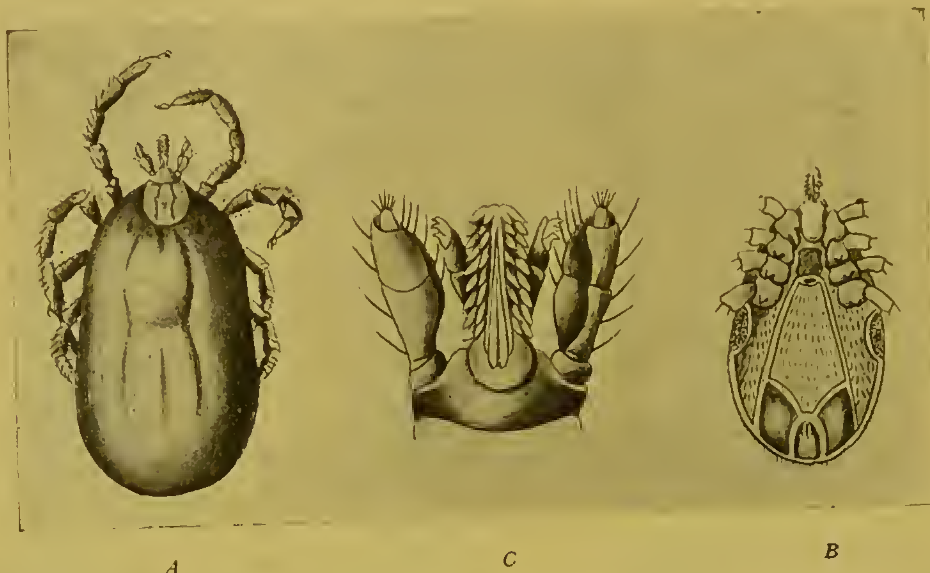


Fig. 354. — *Ixodes ricinus*. *A*, femmina dal lato dorsale; *B*, maschio dal lato ventrale; *C*, rostro.

spesso è assai dolorosa ed è accompagnata nel punto di impianto del parassita da una intensa infiammazione suppurativa. In una giovane signora ho veduto prodursi un vasto ascesso nella regione interna della coscia destra in seguito a puntura d'un *Ixodes hexagonus*.

Per far staccare questi parassiti basta farvi cadere sopra una goccia di petrolio, di essenza di trementina o di benzina. Mai fare una trazione sull'animale; il rostro facilmente potrebbe rompersi, rimanere infisso nella pelle e farsi punto di partenza d'una suppurazione più o meno intensa.

Tanto l'una quanto l'altra specie trasmettono il *Piroplasma bigeminum* ne' bovini e forse anche il *P. canis* (vedi *Protozoologia*).

La sezione delle *Rhipicephaleae* comprende i tre generi *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Margaropus* (*Boophilus*) così distinti fra loro:

Rostro	lungo	. . . .	*Hyalomma*
	corto	solco anale costante - festoni del bordo posteriore ben visibili ne' ♂ e nelle ♀ giovani - palpi piatti alla faccia dorsale, a bordi dritti o convessi - stigmi a virgola con la coda più corta nella ♀ che non nel ♂	*Rhipicephalus*
		mancanza di solco anale - non festoni al bordo posteriore - palpi corti, spessi, angolosi - stigmi circolari - scudo dorsale bruno-marrone, unicolore	*Margaropus*

Del gen. *Hyalomma* ci interessa la *H. aegyptium* (Lin.) che è la più grande Zecca capace di attaccarsi all'uomo. La femmina sazia può arrivare a due centimetri di lunghezza. Ha una tinta rosso-giallastra, corpo appiattito, subquadrato, a bordi posteriori leggermente festonati. Il maschio è lungo 6–8 mm., ha corpo ovale, festonato posteriormente e lo scudo dorsale cuopre tutta la superficie ad eccezione di due strette bordure laterali alquanto rialzate e giallastre. Faccia ventrale biancastra con scudi adanali bruni. È la specie che punge il maggior numero di animali ma preferisce i buoi ed i cavalli. Trasmette la piroplasmosi bovina ed equina. Nell'uomo si comporta come le specie precedenti.

Il gen. *Rhipicephalus* comprende molte specie ma le più comuni nostrane sono il *R. sanguineus* Latr. e *R. bursa* Canestrini e Fanzago, le quali si differenziano fra loro per i seguenti caratteri:

Maschi a scudo con punteggiature numerose	disuguali bene apparenti - appendice caudale nulla o corta	*R. sanguineus*
	uguali, distanti, fine	*R. bursa*
Femmine a scudo	ovale allungato, con punteggiature disuguali	*R. sanguineus*
	ovale corto o tanto largo come lungo - punteggiature uguali.	*R. bursa*

Tanto l'una come l'altra specie si ritiene possono pungere l'uomo, ma, fino ad ora, fu dimostrato solo pel *R. sanguineus*; in ogni modo sembra che la sua puntura non sia dolorosa nè arrechi conseguenze.

Quasi tutti gli animali domestici sono invece attaccati da questi Ixodidi: però, mentre il primo è capace di trasmettere la piroplasmosi canina, il *R. bursa* trasmette il *Piroplasma ovis*.

Il genere *Margaropus* comprende il *M. annulatus* (Say) (*Boophilus bovis* Curtice) che è forse la specie più comune e più diffusa fra noi. Si rinviene di preferenza sui cavalli e sui buoi, nei quali, più degli *Ixodes*, diffonde il *Pirosoma bigeminum* (febbre del Texas).

Nella sezione delle *Amblyommeae* si comprendono i seguenti quattro generi differenziati dal

Rostro	lungo - occhi	presenti.	*Amblyomma*
		assenti	*Aponomma*
	corto - occhi	presenti.	*Dermacentor*
		assenti	*Haemaphysalis*

Il genere *Aponomma* poco può interessarci perchè è parassita de' rettili.

L'*Amblyomma*, assai vicino allo *Hyalomma* ne differisce per l'assenza di scudi adanali ne' maschi, scudi che sono rimpiazzati da piccoli ispessimenti chitinosi situati avanti al bordo posteriore. In questo genere si comprendono parecchie specie: l'*A. americanum* Lin. degli Stati Uniti e Brasile, che fu rinvenuto in un tumore del braccio di una giovane; l'*A. cayennense* Koch o *A. mixtum* Koch che, oltre ad attaccare i cavalli, i buoi ed i cani assale

tanto allo stato adulto come a quello larvale anche l'uomo nell'America intertropicale, divenendo veramente insopportabile con le sue punture; l'*A. Hassalli* Marx e Neuman (*A. hebraeum* Koch) il quale oltre ad assalire l'uomo nell'Africa Orientale Tedesca trasmette negli ovini una malattia, l'*heartwater* probabilmente dovuta ad un virus filtrabile.

Il *Dermacentor* con la specie *D. reticulatus* (Fab.) si può riscontrare in tutti gli animali domestici ed è cosmopolita. I maschi bruno-rossastri lunghi 5·6 mm., sono assai caratteristici, sia perchè hanno la parte posteriore note-

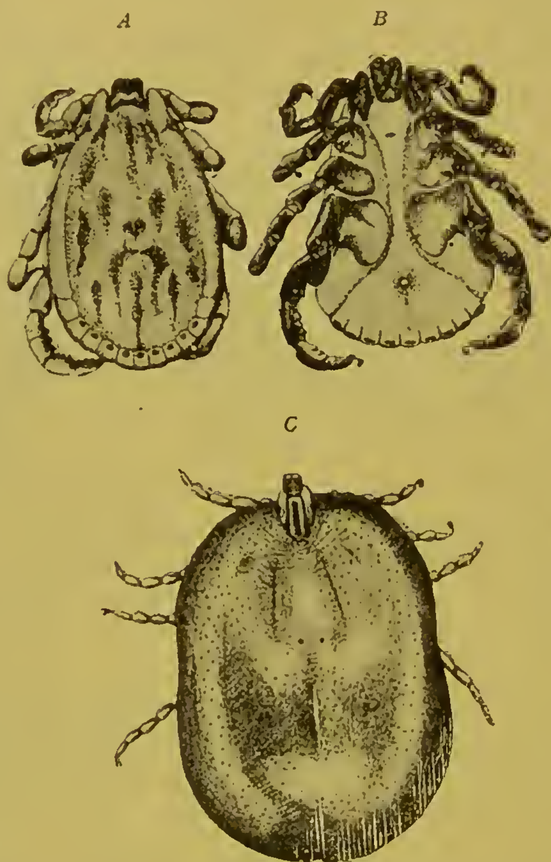


Fig. 355. — *Dermacentor reticulatus*. *A*, maschio dal lato dorsale; *B*, maschio dal lato ventrale; *C*, femmina (da Salomon e Stiles).

volmente più larga delle anteriore sia per avere i festoni e le placche marginali assai evidenti, sia pure per l'enorme sviluppo che prendono le anche del 4° paio di zampe. La femmina sazia misura da 14 a 15 mm. ed ha uno scudo bianco-argenteo con l'addome grigio-olivastro.

In Italia trasmette la piroplasmosi canina, ma sembra che in America inoculi all'uomo quella malattia che va col nome di *febbre delle Montagne Rocciose*.

L'*Haemaphysalis punctata* Canestrini e Fanzago è assai comune sulle nostre pecore ove si localizza di preferenza dietro le orecchie, inoculando la piroplasmosi ovina; si può riscontrare anche sui bovini ne' quali forse trasmette la piroplasmosi bovina. Punge assai di frequente l'uomo.

Sotto-fam. *Argasinae*.

La sottofamiglia *Argasinae* se differisce dagli Ixodini per avere il rostro inferiore. per l'assenza di scudo dorsale e per la mancanza di ambulacri all'ultimo articolo delle zampe. Anche le abitudini sono diverse.

Infatti mentre gli Ixodidi propriamente detti vivono fissati sull'ospite fino a che sieno ripieni di sangue, ciò che dura assai a lungo, gli Argasidi, dopo una suzione di breve durata, abbandonano l'ospite per ritirarsi negli angoli oscuri, nelle fessure de' muri. Hanno abitudini notturne come le Cimici, alla quali anche grossolanamente somigliano. La maggior parte di essi vive negli uccelli, ma attaccano i mammiferi e qualche volta pure l'uomo.

Sono agenti trasmettitori delle spirochetosi.

Due sono i generi che appartengono a questa sottofamiglia. Essi ci offrono i seguenti caratteri:

Corpo	piatto a bordi sottili - non solchi ventrali profondi .	*Argas*
	a bordi spessi - quasi globoso - solchi ventrali profondi	*Ornithodorus*

Gli *Argas* Latr. abitualmente abitano le colombaie, ove succhiano il sangue de' piccioni, mostrandosi dannosi per i giovani, ne' quali preferiscono come luogo di puntura la regione del collo e soprattutto là dove non possono essere disturbati. Poco danno producono se in scarso numero, ma quando il piccione è assalito da molti Argas insieme, parte per il sangue che gli viene sottratto, parte per l'inoculazione della saliva irritante, parte anche perchè il prurito gli impedisce di riposare, non tarda ad ammalare ed anche a morire.

Gli Argas possono attaccare anche l'uomo, producendo generalmente un lieve prurito ed una macchia ecchimotica che scompare in pochi giorni, però può darsi il caso che, inoculando germi settici ed una saliva irritante determinino delle vere infiammazioni suppurative od anche edemi od eritemi, che si manifestano anche in parti lontane dal luogo di puntura.

L'*A. reflexus* Fabr. si distingue facilmente dalle comuni zecche per avere, come si è detto, il rostro situato alla faccia inferiore del cefalo-torace, per i palpi mascellari, che sono antenniformi e per la mancanza dello scudetto dorsale. Il corpo è ovoidale, ristretto alquanto in avanti: è di un colorito bruno con margini giallastri, trasparenti. Il colorito bruno è dovuto all'apparato digerente, che occupa la parte centrale del corpo e manda delle propaggini digitiformi alla periferia. Le zampe sono gialle e liscie: la vulva è situata anteriormente alla base del rostro e in mezzo alle due prime paia di zampe; mentre l'orificio sessuale del maschio trovasi a livello del terzo paio di zampe. La femmina raggiunge i 6-8 mm. per mm. 4 di larghezza. mentre il maschio è lungo appena 4 mm. e largo 3 mm.

È abbastanza frequente sulle nostre colombaie.

Le altre specie che possono essere dannose per l'uomo sono l'*A. persicus* Fischer e l'*A. Brumpti* Neumann, giacchè l'*A. miniatus* Kock, che da alcuni è ritenuto come una specie a sè, somiglia talmente all'*A. persicus* da doversi considerare come una semplice varietà.

L'*A. persicus*, (fig. 356) oltre ad assalire l'uomo, sembra che sia l'agente di trasmissione di alcune spirochetosi umane, mentre che l'*A. Brumpti*, proprio del paese de' Somali, produce una puntura lungamente pruriginosa, la quale

determina una emorragia sottocutanea ed una ecchimosi di più centimetri di diametro, della quale resta poi una traccia assai duratura (fino a nove anni) sotto forma di noduli sottocutanei (Brumpt).

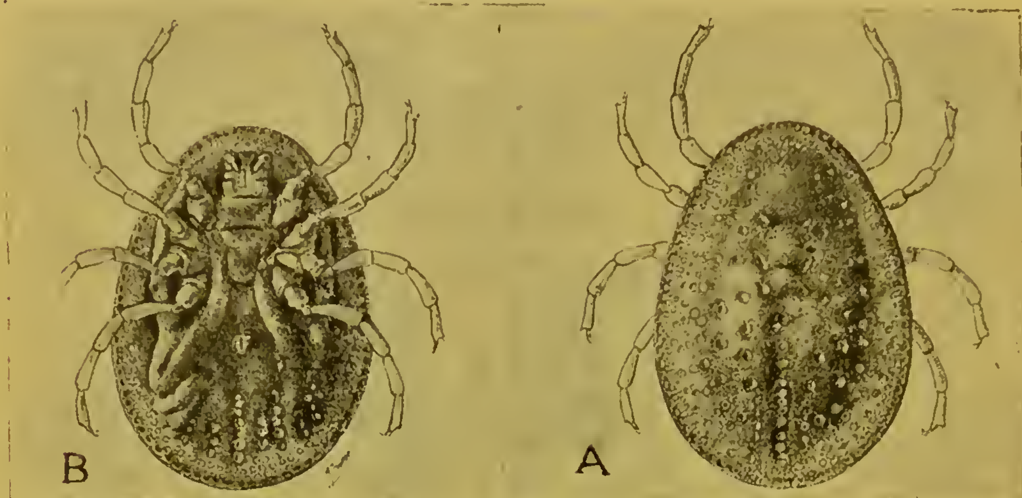


Fig. 356. — *Argas persicus* femmina. A, lato dorsale; B, lato ventrale (dal Brumpt).

La diagnosi differenziale di queste tre specie si basa sui seguenti caratteri:

Corpo	ovalare - bordura marginale	rialzata e formata da pliche sottili e radiali	*A. reflexus*
		composta da festoni rettangolari . .	*A. persicus*
	a bordi laterali paralleli, prolungato in avanti a punta - dorso con depressioni grandi, poligonali		*A. Brumpti*



Fig. 357.— *Ornithodorus moubata*. Femmina e maschio: *a*, dal lato ventrale; *b*, dal lato dorsale (dal Brumpt).

Il genere *Ornithodorus* C. L. Koch, comprende ben 12 specie, delle quali senza dubbio quella cui fu riconosciuta una importanza patogena è l'*O. moubata* Murray (fig. 357) (*O. Savignyi* var. *coeca* Neumann) che è assai diffusa nell'Africa tropicale. Le femmine più grandi dei maschi, raggiungono 12-14 mm., mentre questi non oltrepassano i 6 mm.

Il corpo ovale, è da vivo di un colore verde-bruno superiormente. più chiaro inferiormente. Le zampe e il rostro biancastri. I tegumenti sono coriacei, duri, coperti da tuberosità e granuli splendenti, divisi da solchi disposti simmetricamente.

L'*O. moubata* abbonda nelle case indigene: ha abitudini notturne e punge solo l'uomo durante il sonno. La puntura è alquanto dolorosa e attorno al luogo di attacco si forma un cerchio più o meno esteso, di colorito oscuro, di cui il centro resta bianco.

Questa Zecca inocula nell'uomo la *Spirochaeta Duttoni*, agente della febbre da Zecche (*Tick fever*) africana, che i Gallas ed i Somali chiamano *Courdoud* e gli indigeni dell'Uganda *Bibo* (vedi *Protozoologia*).

Fam. **Gamasidae**.

La famiglia *Gamasidae* non ha che parassiti accidentali per l'uomo, dei quali senza dubbio il più importante è il *Dermanyssus gallinae* De Geer, (fig. 358) che ha un corpo ovale, piriforme, ad estremità posteriore più larga. addome guarnito di setole corte e rade: zampe robuste. Il suo colorito è biancastro se digiuno, rossastro se ha ripieno l'intestino, che si vede per trasparenza.

È un Acaro molto piccolo, giacchè il maschio misura mm. 0.6 per mm. 0.32 e la femmina mm. 0.7 per mm. 0.4.

I *Dermanyssus* vivono nei pollai e, come gli Argas, hanno abitudini notturne. Attaccano i polli, i piccioni, i gallinacci, ma preferiscono sempre i pulcini. Invadono alle volte letteralmente gli uccelli, che essi assalgono, e li fanno morire per esaurimento. Si sono trovati anche nelle cavità naturali di essi, soprattutto nel condotto auditivo esterno e nelle cavità nasali, determinando una infiammazione catarrale.



Fig. 358. — *Dermanyssus gallinae.*

Si incontrano molto spesso sugli animali domestici; ma sul cavallo in particolar modo, producono una vera forma di eteroacariasi, che va col nome di « scabbia dermanissica ».

Nell'uomo provocano un prurito insopportabile e delle lesioni eczematopapulose, e, quantunque normalmente non resti a lungo sul corpo umano, pure Erdl l'ha riscontrato più volte nei tumori cutanei e Benier, Doyon e Judée ritengono ch'esso possa essere l'agente di alcune affezioni cutanee che simulano perfettamente la scabbia.

Classe: INSETTI.

Gli insetti hanno le parti del corpo distinte (testa, torace, addome).

La *testa* porta tanto gli organi di senso (occhi, antenne, palpi), quanto i pezzi boccali (labbro superiore (epifaringe), labbro inferiore, ipofaringe, 2 mandibole e 2 mascelle). Questi possono o mancare in parte, oppure fondersi costituendo la così detta *tromba*.

Al *torace* si articolano le zampe sempre in numero di sei, e le ali che possono essere in numero di due o quattro, oppure essere atrofiche ed in qualche caso mancare.

L'*addome* è formato da un numero variabile di anelli l'ultimo de' quali ci presenta l'armatura genitale diversa nei maschi e nelle femmine.

Gli insetti hanno *metamorfosi:* alcuni *complete* come le Farfalle, le Mosche: dall'uovo cioè nasce la *larva*, che dopo aver mangiato si trasforma in *ninfa* e da questa nasce l'*insetto perfetto:* alcuni *incomplete* come gli emitteri (Cimici) nei quali dall' uovo nasce un insetto che somiglia all'adulto ma è più piccolo, manca d'ali e, dopo un po' di mute, diventa sessuato ed adulto.

Gli insetti parassiti dell'uomo appartengono ai due ordini dei *Ditteri* ed *Emitteri* o *Rincoti*. I primi hanno due le ali anteriori, mentre le posteriori sono trasformate in *bilancieri:* hanno metamorfosi complete. I secondi sono forniti per la massima parte di quattro ali (le anteriori variabili e le posteriori membranose), e subiscono metamorfosi incomplete.

Ord. **Rincoti od Emitteri.**

I Rincoti parassiti dell'uomo si rinvengono in due sotto ordini: gli *Atteri* cioè, che sono del tutto privi di ali (*Pediculus* e *Phthirius*) e gli *Eteropteri* che hanno il primo paio ridotto a due semi-elitre ed il secondo costituito da ali membranose.

Gli *Atteri* alla loro volta ci offrono due soli generi parassiti, distinti dai seguenti caratteri:

Antenne di 5 articoli - addome	senza prolungamenti conici laterali - zampe tutte egualmente forti - torace più ristretto della parte anteriore dell'addome	Gen. *Pediculus*
	con prolungamenti conici laterali - 1° paio di zampe sottili con unghie aguzze - torace più largo dell'addome.	Gen. *Phthirius*

Due sono le specie del genere *Pediculus* Lin. che ci interessano. Esse si differenziano assai facilmente sopratutto per le particolarità che si notano nelle antenne e cioè:

Articoli delle antenne	tutti uguali - addome a margini oscuri . . .	*P. capitis*
	disuguali - il secondo più lungo - addome non bordato di scuro	*P. vestimenti*

Il *Pediculus capitis* (de Geer.) (fig. 359).

Ha un colorito giallo grigiastro; ci presenta l'addome composto di sette segmenti a margini laterali più scuri. Il maschio misura mm. 1.8 su mm. 0.7 di larghezza, mentre la femmina è lunga mm. 2.5 su 1 mm. di larghezza. Il maschio differisce dalla femmina anche per l'estremità dell'addome, che in questa è formata da due lobi, mentre in quello è rotondeggiante e munita di organo copulatore.

Il Pidocchio del capo vive generalmente nei capelli e più specialmente nella regione occipitale, ma fu trovato anche nelle sopracciglia e nella barba.

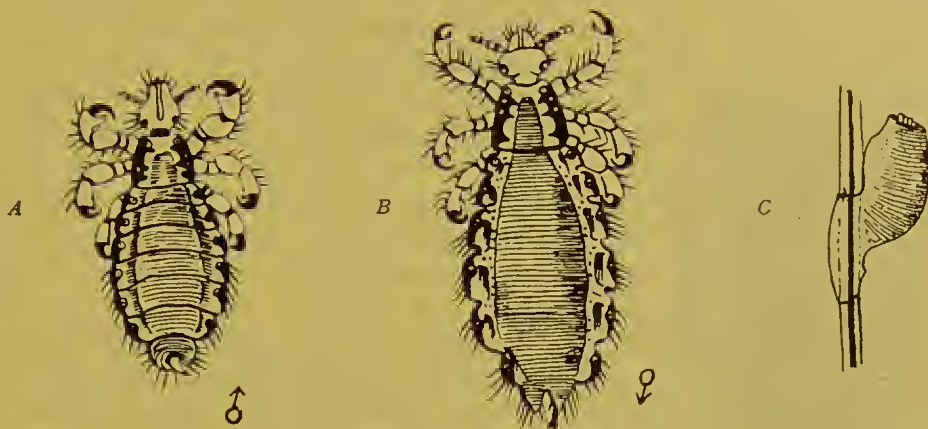


Fig. 359. — *Pediculus capitis*. *A*, maschio; *B*, femmina; *C*, lendine attaccata ad un pelo.

Si riscontra di preferenza negli individui sudici ed i più frequentemente sono attaccati i bambini, i vecchi e convalescenti di malattie acute e gravi. La femmina depone le uova (*lendini*) nei peli ai quali li fissa.

I Pidocchi del capo sono assai voraci, succhiano almeno una volta al giorno ed il loro rostro, penetrando nel cuoio capelluto, produce una irritazione che dà luogo a delle vescicole e vescico-pustole, specialmente nei bambini e negli individui linfatici, nei quali l'eruzione pustolosa può assumere il carattere di una impetigine. Queste lesioni, unite a quelle che produce il continuo grattamento, dànno luogo ad una essudazione che si trasforma in croste spesse, abbondanti, le quali uniscono fra di loro i capelli formando tutto un insieme che serve meravigliosamente di nido ai parassiti.

La diagnosi è facile e si basa sulla constatazione del parassita o delle lendini aderenti ai capelli.

L'uovo prima deposto è quello che si trova più lontano dalla cute; generalmente esso schiude in cinque o sei giorni, i giovani che ne escon fuori divengono adulti dopo 15-20 giorni. Ora, tenendo conto che una sola femmina può deporre 50-60 uova, si vede bene che il Pidocchio del capo può moltiplicarsi con straordinaria rapidità, e, da calcoli fatti, alla terza generazione, verso la fine cioè del terzo mese, da una sola femmina possono generarsi da 125,000 a più che 200,000 individui.

Il Pidocchio del capo varia di colore secondo le varie razze umane, e questo mimetismo costituisce un fenomeno protettivo per il parassita.

Il passaggio del parassita da un individuo malato ad un sano è assai facile e si compie esclusivamente per contatto. Data la sua frequenza nei

bambini il Pidocchio del capo è assai frequente nelle scuole; occorre quindi una continua ed attenta sorveglianza specialmente in quelle femminili, giacchè nelle bambine, che sogliono portare i capelli lunghi, più facilmente si nascondono e moltiplicano i parassiti.

Il taglio od anche la rasatura di capelli ed una generosa unzione del capo con olio o petrolio guarisce radicalmente la pediculosi del capo.

Il *Pediculus vestimenti* (Nitzsch) (fig. 360).

È più grande del precedente, giacchè il maschio misura circa 3 mm. di lunghezza per mm. 1.10. È di un colorito bianco sudicio, con il capo acuminato all'innanzi: ha le antenne più lunghe e l'addome è costituito da otto segmenti.



Fig. 360. — *Pediculus vestimenti* femmina.

Vive nei vestiti che ricoprono il corpo di persone sudicie e si porta sulla pelle solo al momento in cui ha bisogno di nutrirsi. Anche nei vestiti, specialmente lungo le cuciture, la femmina deposita le uova, che appaiono sotto forma di piccoli punti grigio-scuri.

I piccoli nascono molto rapidamente ed in 18 giorni sono capaci di riprodursi.

Le lesioni prodotte dalle punture consistono in papule più o meno larghe, accompagnate da un intenso prurito.

Anche qui il grattamento produce delle escoriazioni e quindi una crosta sanguinolenta brunastra.

Durante la puntura, che viene effettuata di preferenza alla sera, il parassita inocula una saliva irritante, la quale, provocando forse la formazione di pigmento, lascia una macchia oscura. Dal ripetersi continuo di queste inoculazioni, specialmente nelle pediculosi di vecchia data, ne risulta una colorazione permanente oscura della cute che forma, direi, quasi la caratteristica della pediculosi del corpo. Questa melanodermia, che va col nome di *malattia de' vagabondi*, si localizza di preferenza sulla regione interscapolare, ma può anche generalizzarsi ed estendersi alle mucose.

Il Pidocchio del corpo si moltiplica con una facilità straordinaria; è parassita esclusivo dell'estrema miseria: si riscontra con maggiore facilità nei vecchi.

Il passaggio dall'individuo malato al sano si fa per il tramite de' vestiti o, più facilmente, della biancheria vecchia nelle cui pieghe si nasconde e vive il parassita anche abbastanza a lungo senza prender cibo. È quindi assolutamente necessario, per impedire la trasmissione o il ripetersi dell'infestazione, far subire alla biancheria un buon bucato ed ai vestiti un passaggio all'autoclave.

Sembra che il *Pediculus vestimenti* abbia una importanza nella trasmissione delle febbri ricorrenti (Sergent e Foley) e forse anche del tifo esantematico (Nicolle).

Il *Phthirius pubis* (Lin.).

Conosciuto sotto il nome di *Piattola* ha una forma arrotondita ed una tinta biancastra; ha la testa corta, ristretta in avanti, addome largo formato di otto segmenti, di cui però il 2°, 3° e 4° sono fusi fra di loro in modo da far sembrare l'insetto costituito da soli cinque segmenti. Ai fianchi di esso si notano delle protuberanze ricche di ciuffi di peli. Le zampe anteriori sono più esili delle altre, le quali sono armate da robusti unghioni.

Il maschio è lungo circa un millimetro e la femmina raggiunge appena i 2 mm. Vive alla base dei peli del pube e del perineo, ma si può trovare nell'addome, sotto le ascelle e nel petto e qualche volta anche in quelli della barba, de' baffi e delle sopracciglia. Aderisce fortemente alla superficie cutanea ed il suo distacco provoca un leggero dolore.

La femmina deposita da 10 a 15 uova piriformi che fissa alla base del pelo. I piccoli nascono dopo una settimana circa e dopo 15 giorni sono atti alla riproduzione.

La loro puntura provoca un intenso prurito il quale, pure essendo continuo, si esacerba la notte. La saliva irritante che viene inoculata, oltre al prurito ed a numerose e piccole papule rossastre, determina in alcuni individui delle macchie speciali oscure della pelle che presero il nome di *macchie bleu* e che Duguet riuscì a riprodurre sperimentalmente inoculando sotto cute il prodotto delle glandole salivari di Piattole adulte.

Sebbene il passaggio da un individuo ad un altro si verifichi con maggior frequenza durante i rapporti sessuali, pure esso può avvenire sia dormendo in letti, le cui lenzuola non passarono al bucato, sia sedendo in latrine non pulite, sia anche per il tramite delle bagnarole ove prima abbia preso il bagno un malato.

Più del comune unguento mercuriale, che non è sufficiente ad uccidere le uova e che provoca assai spesso idrargirismo, è consigliabile di usare una soluzione di sublimato corrossivo in aceto (1:300) il quale uccide le uova, ne diminuisce l'adesione ai peli permettendo che esse vengano facilmente asportate da un fitto pettine.

Un gran numero di Pidocchi che vivono sui mammiferi (*Haematopinus*, *Trichodectes*) o sugli uccelli da cortile (*Lipeurus*, *Goniodes*, *Goniocotes*, *Docophorus*, *Trinoton*, *Menopon*, ecc.) possono accidentalmente riscontrarsi sulla pelle umana. Essi però vi rimangono per poco tempo, non vi depositano mai le uova e, solo eccezionalmente, riescono a pungere.

Fra i *Rincoti eteropteri* come parassiti dell'uomo dobbiamo considerare la *Cimice de' letti* (*Acanthia lectularia* Fabr.).

Essa è di forma ovalare, lunga circa 5 mm. per 3 mm. di larghezza; molto depressa, a bordi sottili, di colorito rosso bruno o ruggine e ricca di peli fitti e corti.

La testa, a forma di losanga, porta lateralmente due grossi occhi neri sporgenti e due lunghe antenne quadriarticolate. Essa è situata in una profonda insenatura del protorace, i cui bordi laterali sono sviluppati, sottili e rialzati. Il metatorace porta i rudimenti delle ali sotto forma di scaglie ovalari, le quali cuoprono quasi per intero il primo segmento dell'addome: questo ha forma ovalare alquanto appuntita posteriormente, è di una fragilità straordinaria; si rompe alla minima pressione, tramandando un odore fetido,

dovuto al liquido contenuto da una glandola speciale situata nel centro del metatorace, la quale sbocca ventralmente in mezzo alle zampe posteriori.

La femmina depone le uova in pacchetti più o meno voluminosi nei mesi di marzo, maggio, luglio e settembre

Esse sono oblunghe, bianche e sono fornite di un operculo dal quale, se la stagione è favorevole, dopo otto giorni dall'avvenuta deposizione, esce la larva. Questa non differisce dall'adulto che per la piccolezza, per il colorito più pallido e per la mancanza di rudimenti dell'ala. Prima di divenire insetto adulto la larva deve subire quattro o cinque mute e per la completa evoluzione occorrono almeno undici mesi, di guisa che non è raro il caso che le giovani, nate dalle uova deposte in settembre, muoiano ai primi freddi, mentre quelle che al sopraggiungere dell'autunno si trovano più avanti nello sviluppo divengono adulte e capaci di riprodursi nella stagione successiva. Durante l'inverno non prendono cibo e restano nascoste nelle fessure de' mobili, de' letti, dietro le carte da parati, nelle connessure de' pavimenti e dei soffitti di legno donde escono solo verso la fine di febbraio od ai primi di marzo.

La Cimice punge solo durante la notte, sopratutto nelle parti scoperte del corpo (faccia, collo, mani) e nell'assalire l'uomo essa è guidata dal fine odorato e, quando non può giungere a lui altrimenti, si porta a perpendicolo sul letto e si lascia cadere.

La puntura ch'essa determina è urente, ma l'intensità e la durata del prurito è variabile secondo gli individui.

La distruzione di questo sudicio insetto è facile quando si può adoperare il petrolio il quale, specialmente se adoperato periodicamente per qualche tempo, si mostra arma preziosa e micidiale pel parassita.

La sua azione è durevole e dato il grande potere di penetrazione esso giunge ad uccidere anche le giovani larve che vivono più profondamente negli interstizi del legname o de' letti di ferro. In sostituzione del petrolio rendono anche buoni servigi l'olio essenziale di trementina o la benzina.

Ma là dove questi liquidi non possono adoperarsi, ad esempio nei paglericci di foglia o nei materassi, si usano con discreto successo le polveri insetticide consparse con i comuni insufflatori. In ogni modo più che gl'insetticidi giova la grande pulizia.

È bene rammentare che le cimici, dato il potere che hanno di resistere al digiuno, possono trovarsi vive nelle case che rimasero disabitate per molto tempo, fino anche a due anni.

Si ritiene che la Cimice possa essere l'agente trasmettitore sia di alcune malattie batteriche (tubercolosi, peste), sia di alcune altre da protozoi (Kala-azar, bottone d'Oriente, ecc. ecc.).

Ord. **Ditteri.**

I Ditteri hanno apparato boccale conformato per pungere e per succhiare; sono provvisti di due sole ali (le anteriori) membranose, mentre le due posteriori sono rudimentali e trasformate in *bilancieri*.

Hanno metamorfosi complete. Le larve che si sviluppano dalle uova hanno due forme distinte: le une ci presentano una testa con apparato boccale, occhi ed antenne più o meno sviluppate, le altre invece sono *acefale* e la loro estremità anteriore è assottigliata, qualche volta ci offre il rudimento

delle antenne e nel suo centro si vede l'apertura boccale munita di due uncini cornei robustissimi.

Le prime subiscono una muta avanti di trasformarsi in ninfe e queste alla lor volta possono essere mobili come quelle delle Zanzare o fisse come quelle dei Tafani; le seconde invece non subiscono mute, crescono rapidamente e si trasformano in una *pupa* a barilotto, dalla quale, dopo un tempo variabile, nascerà l'insetto perfetto o *imagine*.

L'apparato boccale subisce delle grandi modificazioni. In alcuni Ditteri i pezzi boccali si saldano fra loro, si modificano e costituiscono una tromba molle (Mosca domestica) incapace di pungere: essi si nutrono allora di materie organiche in decomposizione o delle secrezioni naturali che si trovano alla superficie del corpo umano (sudore, lacrime, muco nasale, ecc.). In altri invece l'apparato boccale è atto a pungere e per nutrirsi succhiano il sangue.

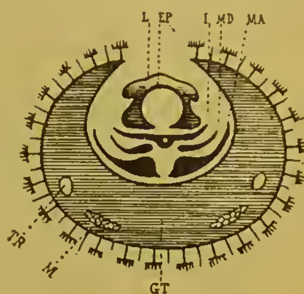


Fig. 361. — Sezione trasversale dell'apparato pungente di un Dittero (Zanzara). GT, guaina della tromba; L, epifaringe; I, ipofaringe; MD, mandibole; MA, mascelle.

In questo caso i pezzi che costituiscono la proboscide o tromba possono essere in numero di sette (labbro inferiore o guaina della tromba, labbro superiore od epifaringe, ipofaringe, 2 mandibole rigide, 2 mascelle) (fig. 361). Qualche volta anche nella stessa specie vediamo alcuni pezzi atrofizzarsi completamente o saldarsi fra di loro: cosicchè mentre le femmine hanno tutti i pezzi boccali i maschi ne hanno solo cinque (fig. 362).

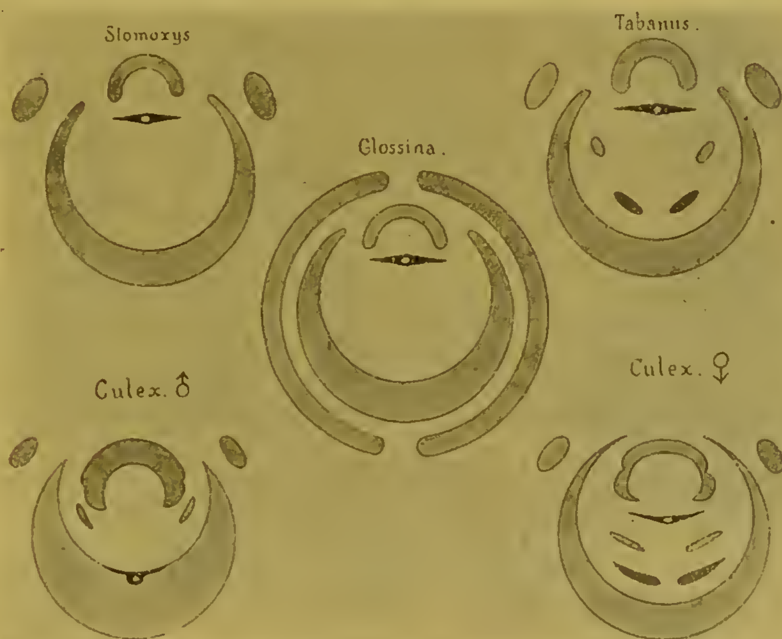


Fig. 362. — Sezione trasversale dell'apparato pungente di varî Ditteri per dimostrare l'atrofia di alcuni pezzi boccali.

Dato il grande progresso degli studi attuali è assai facile comprendere come i Ditteri, siano essi considerati quali veri parassiti allo stato adulto o

larvale, sia quali agenti propagatori e trasmettitori di malattie infettive o parassitarie, abbiano una grande importanza. Ed alle specie di cui già si conosce l'azione patogena se ne aggiungono ogni giorno di nuove. Talchè oggi il numero dei Ditteri che direttamente o indirettamente sono nocivi all'uomo è veramente stragrande.

Per questo, non potendo scendere alla descrizione minuta di ognuno di essi, mi limiterò solo a far noto come l'ordine de' Ditteri sia diviso in tre sotto ordini che presentano i seguenti caratteri:

- Ali anteriori
  - presenti
    - corpo corto, tozzo - antenne corte di tre articoli - ali larghe. . . . . . sott'ord. *Brachiceri* - tipo Mosca comune
    - corpo allungato - antenne filiformi con 6-15 articoli - zampe lunghe, sottili - ali grandi, strette . . . . . sott'ord. *Nemoceri* - tipo Zanzara
  - atrofiche - corpo compresso lateralmente - zampe posteriori atte al salto. . . sott'ord. *Afanitteri* - tipo Pulce

E d'altra parte, limitandomi agli esempi più comuni, per essere più chiaro e perchè più facilmente ne sia compresa l'importanza, dividerò i Ditteri, che possono interessarci, secondo il loro modo di comportarsi per rispetto all'uomo e cioè:

1° parassiti obbligati allo stato adulto. . . es. *Sarcopsylla penetrans*

2° parassiti obbligati allo stato larvale. .
- » *Hypoderma bovis*
- » » *diana*
- » » *lineata*
- » *Dermatobia cyaniventris*
- » *Cordylobia anthropophaga*
- » *Rhinoestrus nasalis*
- » *Oestrus ovis*

3° parassiti facoltativi allo stato larvale
- *a*) nella cute o nelle cavità naturali (*Myiasis cutanee* e *cavitarie*)
  - » *Compsomyia macellaria*
  - » *Lucilia coesar*
  - » *Calliphora vomitoria*
  - » *Sarcophaga carnaria*
  - » » *magnifica*
  - » » *affinis*
- *b*) nell'intestino (*Myiasis intestinali*) . . . . » *Piophila casei*

4^c agenti trasmettitori di malattie	*a*) per inoculazione. .	es. *Pulex irritans*
		» » *cheopis*
		» *Ctenocephalus canis*
		» *Tabanus autumnalis*, ecc.
		» *Crhysops coecutiens*
		» *Haematopota pluvialis*
		» *Stomoxys calcitrans*
		» *Haematobia stimulans*
		» *Glossina palpalis*
		» *Simulium reptans*
		» *Phlebotomus papatasii*
		» *Culex pipiens*
		» *Anopheles maculipennis*, ecc.
		» *Stegomya fasciata*
	b) per disseminazione	» *Musca domestica*, ecc.
		» *Calliphora vomitoria*, ecc.
		» *Sarcophaga carnaria*, ecc. ecc.

1° DITTERI PARASSITI OBBLIGATI ALLO STATO ADULTO.

La *Sarcopsylla penetrans* L. o Pulce della sabbia (fig. 363) differisce poco da una Pulce comune: è un po' più piccola giacchè misura poco più di un millimetro. Ha un colorito bruno-rossastro. Vive nelle regioni tropicali dell'America e dell'Africa e qualche volta fu riscontrata sui transatlantici in immigranti dall'America meridionale diretti in Italia.

I maschi e le femmine non fecondate si comportano come tutte le Pulci, vivono però in mezzo alle erbe secche nei boschi, nelle case e sopratutto nella sabbia e solo transitoriamente restano sull'uomo per succhiarne il sangue. La femmina fecondata invece diviene un parassita cutaneo obbligato: penetra nella pelle dell'uomo ed anche degli animali, e sceglie, come quelle che sono più facilmente aggredibili, la regione interdigitale e la pianta dei piedi, quella delle gambe specialmente in coloro che son costretti a camminare scalzi. Una volta annicchiata sotto la cute il suo volume diviene enorme, perde la sua forma primitiva, raggiunge la grossezza di un pisello.



Fig. 363. — *Sarcopsylla penetrans*. *A*, femmina non fecondata; *B*, femmina ovigera (da Moniez).

L'addome così ingrossato contiene circa un centinaio di uova, che, espulse al difuori, si sviluppano in terra come quelle delle comuni Pulci.

Nel momento in cui il parassita si introduce sotto la pelle non si avverte altro che un intenso prurito, però, man mano che l'addome si ingrossa, possono prodursi intensi dolori dovuti all'irritazione che si stabilisce nei tessuti

circostanti. Se non sopravvengono complicazioni settiche, la lesione si riduce ad un piccolo tumore biancastro, circoscritto, della grossezza d'un pisello, con una apertura centrale. Questa corrisponde al punto d'ingresso, e resta costantemente beante; da essa fan sporgenza gli ultimi anelli dell'addome mentre più profonda sta la testa del parassita che succhia il sangue dalle papille dermiche.

Man mano che di essa aumenta il volume, il quale è in rapporto alla maggiore o minore maturità delle uova, attorno al parassita si stabilisce una reazione infiammatoria che termina con l'espulsione della femmina, la quale allora cade in terra ove effettua il parto. Le larve escono in genere dopo otto giorni dalla deposizione dell'uovo e dopo circa 20 giorni possono trasformarsi in insetti perfetti. Ma spesso il pertugio del piccolo tumore diviene porta d'ingresso a germi patogeni, allora si sviluppano ascessi più o meno profondi, ulceri, piaghe e persino necrosi delle ossa e dei tendini. Una volta che il parassita sia giunto sotto la pelle solo l'enucleazione (*échiquage*), seguita da lavaggi antisettici, può liberarcene e solo l'uso di portare calzature e vestiti solidi e resistenti, di dormire sugli *hamacs* può difenderci da così molesto parassita.

2° DITTERI PARASSITI OBBLIGATI ALLO STATO LARVALE.

Fra questi abbiamo bellissimi esempi nelle specie che vivono negli animali e danni abbastanza rilevanti al bestiame, specialmente della Campagna romana, il quale per lo più vive allo stato brado, vengono prodotti dalle varie specie del genere *Gastrophilus* (*G. haemorroidalis, nasalis, pecorum* ed *equi*). Nei cavalli le larve di questo Dittero si fissano alla parete dello sto-

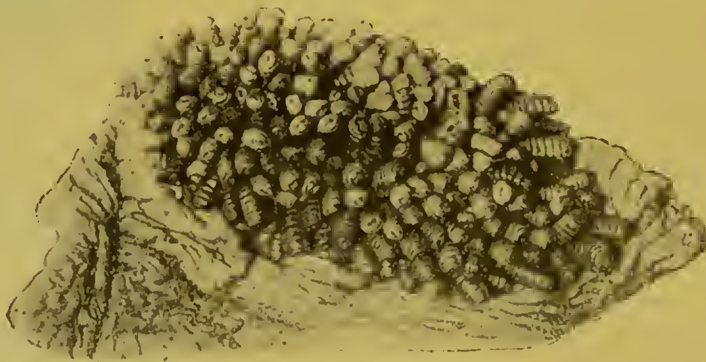


Fig. 364. — Larve di *Gastrophilus* fissate alle pareti dello stomaco di un cavallo (dal vero).

maco ove possono occupare delle zone assai vaste ed essere in numero assai considerevole (fig. 364). Nelle pecore invece le larve dell'*Oestrus ovis* si localizzano nelle cavità nasali, ne' seni frontali, determinandone assai spesso la morte.

Nell'uomo solo eccezionalmente si rinvennero parassite della cute le larve di *Gastrophilus* mentre con grande frequenza si riscontrano casi di *myiasis cutanea* dovuti alle seguenti specie:

Hypoderma bovis (De Geer) (fig. 365).

È una mosca nera vellutata. Ha 13-15 mm. di lunghezza. Torace con bande longitudinali nere, addome con la base grigia, il mezzo con fascia nera e l'apice di colore giallo arancio. È comune in tutta Europa e si trova nei pascoli dei bovini. La femmina depone con un ovopositore le uova sulla pelle di questi animali in mezzo al pelame. Non si conosce esattamente come la larva giunga sotto la pelle, ma assai presumibilmente essa si insinua in un follicolo del pelo e da qui va progressivamente al connettivo sottocutaneo. Qui si determina un tumore il quale ha nel centro una apertura: esso crescendo può raggiungere la grossezza di un uovo di pollo.



Fig. 365. — *Hypoderma bovis.*

La larva nell'interno di esso si nutre della sostanza purulenta e sta con le stigme rivolte verso l'esterno. Dopo raggiunto il massimo dello sviluppo esce a ritroso per lo stesso foro d'entrata e cade al suolo ove si trasforma in ninfa.

Fu riscontrata anche nell'uomo e in esso rinvenendo i tessuti più delicati fu vista percorrere dei tratti molto lunghi sotto la pelle.

Come l'*H. bovis* si comportano l'*H. diana* Brauer, e l'*H. lineata* (de Villers) comuni in tutta l'Europa, le larve delle quali furono riscontrate parassite nell'uomo.

Dermatobia cyaniventris Macquart (fig. 366).

È lunga 14-16 mm. ha la faccia gialla, il torace grigio e l'addome bleu-acciaio con la base bianco sudicio. Le ali tendenti al rossiccio. La larva non ancora matura ha una forma caratteristica: la porzione anteriore rigonfiata porta delle spine assai ben visibili, la posteriore assottigliata come una coda. La larva in questo stadio di sviluppo prende il nome di *Ver macaque* per differirla dalla larva adulta, ovalare che si chiama *Berne* o *Torcel* (fig. 367).



Fig. 366. — *Dermatobia cyaniventris* (dal Manson).

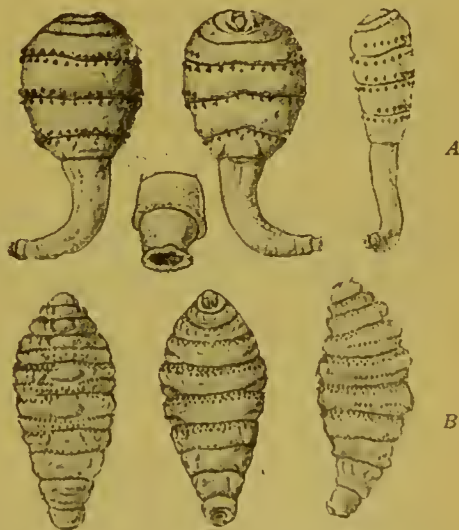


Fig. 367. — Larve di *Dermatobia cyaniventris* in vario periodo di sviluppo (dal Blanchard). *A*, larva non ancora matura (*Ver macaque*); *B*, larva matura (*Berne* o *Torcel*).

Dapprima si credeva che appartenessero a due specie diverse ma il Blanchard ha potuto stabilire che queste due forme altro non sono che due fasi della stessa larva e che la seconda nasce, dopo una muta, dalla prima. L'intero accrescimento larvale si compie sotto la cute degli animali (buoi, cani) ed assai frequentemente anche dell'uomo nell'America del Sud. Fu riscontrata (Sangalli) anche in Italiani reduci dal Brasile. La Mosca adulta deposita le sue uova sulla pelle alla base dei peli; la piccola larva, che da esse nasce, sembra che si insinui nel follicolo del pelo, che dilata ed irrita col suo crescere determinando co' suoi movimenti atroci dolori.

Ben presto si forma una tumefazione a contenuto purulento entro la quale compie il suo lento sviluppo. Quando la larva ha raggiunto il massimo della sua crescenza il tumoretto si apre all'esterno ed essa cade in terra ove passa allo stato di ninfa.

Cordylobia anthropophaga (E. Blanchard) (fig. 368).

È una mosca lunga 8-10 mm. e di un colorito grigio-giallastro con due bande longitudinali nere sul torace e delle macchie oscure nella parte poste-



Fig. 368. — *Cordylobia anthropophaga*. *A*, femmina; *B*, larva (dal Manson).

riore dell'addome. Le ali sono alquanto affumicate e le zampe giallastre. La larva è lunga 8-12 mm., ha un colorito bianco sudicio con i segmenti anteriori quasi uniformemente ricoperti da piccole spine rivolte all'indietro. È comune nell'Africa e più specialmente nella Guinea e nella Costa d'Oro, ove sia negli animali (cani, gatti, capre, scimie, ecc.) sia nell'uomo va col nome di *Ver de Cayor*, e determina lesioni quasi uguali a quelle prodotte dalle specie precedenti.

Altre specie di Ditteri le cui larve vivono parassite obbligate allo stato larvale negli animali si rinvennero nell'uomo, ma sarebbe troppo lungo enumerarle tutte: citerò solo altre due forme che furono rinvenute in Italia.

Rhinoestrus nasalis (De Geer).

Si trova assai frequentemente nel naso ed occhi de' cavalli e fu trovato nella congiuntiva umana in Italia dal dott. Baquis Elia.

Oestrus ovis (Linné).

Questa specie depone le larve nelle narici delle pecore. Casi frequenti nell'uomo si rinvennero da Ed. ed Et. Sergent nell'Algeria (Grande Kabylia, Piccola Kabylia, Sahra orientale) e dal dott. Saitta il quale in Sicilia, le rinvenne in sei individui, nei quali avevano determinato riniti e laringiti accompagnate da dolori più o meno gravi.

3° PARASSITI FACOLTATIVI ALLO STATO LARVALE.

Molte larve di Mosche, le quali normalmente si sviluppano sulle sostanze organiche in decomposizione, possono vivere ugualmente bene nei tessuti animali viventi divenendo veri e propri parassiti e arrecando spesso danni non lievi. Questa forma di parassitismo è quella che va col nome di *myiasis*.

A secondo del loro *habitat* avremo: una *myiasis cutanea*, che può suddividersi in *myiasis dermica* ed in *myiasis superficiale*, una *myiasis cavitaria* ed una *myiasis intestinale*.

La *myiasis dermica* si ha quando le larve di queste mosche, comportandosi come quelle in cui è obbligatorio il parassitismo, vivono e si sviluppano nello spessore della cute. Ma mentre in queste è un fatto necessario, normale, in quelle è puramente accidentale. Infatti i casi di tal genere sono



Fig. 369. — *Sarcophaga affinis*. *A*, Mosca adulta; *B*, larva; *C*, ninfa da cui è uscita l'adulta.

piuttosto scarsi nella letteratura e, se si tolgono quelli in cui la larva non fu identificata con esattezza (casi di Shaw, Hagen, ecc.), i più importanti sono dovuti alle larve della *Musca domestica* rinvenute sotto la pelle di un bambino (Fourcault), a quelle della *Calliphora vomitoria* estratte da una tumefazione della guancia di un ragazzo (Jannuzzi) ed a quelle della *Sarcophaga affinis* Meig. (fig. 369) rinvenute nel cuoio capelluto di un ragazzo di 13 anni nel quale avevano prodotto delle piccole tumefazioni ed ascessi assai dolenti (Alessandrini).

La *myiasis superficiale* è assai frequente nei paesi caldi e si verifica specialmente quando ferite o piaghe vengono lasciate allo scoperto, quando sono insufficientemente coperte, raramente lavate e suppurate. Le Mosche in genere, ma sopratutto la *Calliphora vomitoria* (Mosca bleu della carne), la *Lucilia coesar* (Mosca verde) e la *Sarcophaga carnaria* (Moscone grigio), attratte dal cattivo odore che tramanda la piaga, vi depongono sopra numerose uova o larve che sviluppandosi producono intensi dolori distruggendo tutto quanto ostacola il loro cammino: grasso, muscoli, vasi e nervi.

Lo stesso può verificarsi nella *myiasis cavitaria*. Questa si localizza nelle cavità naturali in specie se precedentemente erano ammalate. Di guisa che tal sorte di miasi si osserva spesso negli ammalati di otorrea, ozena, scolo vaginale, ecc. e, sebbene molte Mosche possono determinarla, le specie più pericolose sono senza dubbio quelle che appartengono al genere *Sarcophaga*. Essendo vivipara, questa Mosca può deporre fino a 20,000 larve in un tempo assai breve e queste, sviluppandosi assai rapidamente, ed essendo di una voracità eccessiva, son capaci di determinare delle larghe distruzioni di tessuti e di provocare anche la morte. A prova di ciò basterebbe citare i casi descritti dal Saltzmann e Cloquet, i quali ci narrano di individui letteralmente divorati da queste larve, e quelli riportati dal Portchinsky, il quale riporta che le larve della *Sarcophaga magnifica* Schiner sono assai frequenti nel naso, nelle orecchie e nel palato de' fanciulli russi del distretto di Mohilev. In essi producono dolori ed emorragie tali da ridurre i poveri bambini in uno stato veramente compassionevole e grave: in specie quando si sviluppano nelle orecchie, ove, producendo la perforazione del timpano, giungono nell'orecchio medio, nella mastoide e provocano non solo lesioni locali ma anche meningiti mortali.

Fortunatamente casi di così eccezionale gravità sono piuttosto rari, mentre invece sono assai frequenti anche fra noi casi di minor gravità che si verificano sopratutto nelle cavità nasali sia in individui affetti da ozena, sia anche in quelli che, per lo stato compassionevole di miseria e di sudiciume in cui si trovano, invitano, con il cattivo odore che tramandano, le Mosche a deporre nel loro naso le voraci larve. Io stesso ho descritto un caso di *myiasis* delle fosse nasali dovuto alla *Sarcophaga carnaria* in un individuo che presentò dapprima tutti i sintomi di una rinite acuta, cioè: dolore gravativo, bruciore e prurito delle cavità nasali, accompagnati alle volte da dolore alla fronte per diffusione del processo infiammatorio ai seni frontali. A questi fenomeni si aggiungeva sovente un senso di formicolio molto molesto ed un rumore particolare, simile a quello che producono i tarli del legno. Alla secchezza della mucosa seguì dapprima la secrezione di un liquido acquoso, abbondante ed irritante, che non tardò a divenire purulento. La respirazione, per l'occlusione delle fosse nasali, era ostacolata e la voce nasale. Quasi costantemente vi era febbre e spesso abbondanti epistassi.

All'esame diretto, previa una lavanda con semplice acqua bollita, si scorgevano le larve aderenti colla loro estremità anteriore alla mucosa nasale, che si presentava ulcerata, ove sanguinante ed ove ricoperta di croste secche.

Si ha *myiasis intestinale* quando larve di Mosche, deglutite con gli alimenti, possono soggiornare un tempo più o meno lungo nell'intestino e determinarvi delle lesioni traumatiche più o meno gravi. Nè tutti i casi descritti, secondo me, debbono considerarsi come veri e propri casi di *myiasis*: spesso si trattò di reperto accidentale nelle feci di larve che furono deposte e si svilupparono nello stesso vaso, altre volte invece si trattò di larve espulse morte dall'intestino senza aver prodotto alcun disturbo.

Assai lunga è la lista dei Ditteri le cui larve furono riscontrate nel tubo digerente umano, ma, secondo il mio modo di vedere, per la sola *Piophila casei* L. (fig. 370) dopo i lavori del Thébault e miei fu dimostrata l'azione

patogena. Questa piccola Mosca che si trova assai di frequente nei depositi di formaggio e nelle stesse pizzicherie è lunga circa 4 mm. Il colorito è verde-cupo lucente, con le ali leggermente affumicate e che son tenute poco divaricate quando l'insetto è allo stato di riposo. Le zampe hanno un colorito giallo-paglierino, alternato da bande nere. Le femmine depositano da 75 a 90 uova che dopo 15 giorni circa dànno nascita a piccolissime larve. Queste in altri 15 giorni compiono la fase larvale e divengono mature; in questo stadio hanno un colorito bianco-avorio; sono lunghe 7-10 mm. e larghe 1-1.5 mm. ed alcuni segmenti del corpo ci presentano ventralmente una triplice serie trasversale di robusti aculei con l'apice rivolto posteriormente.

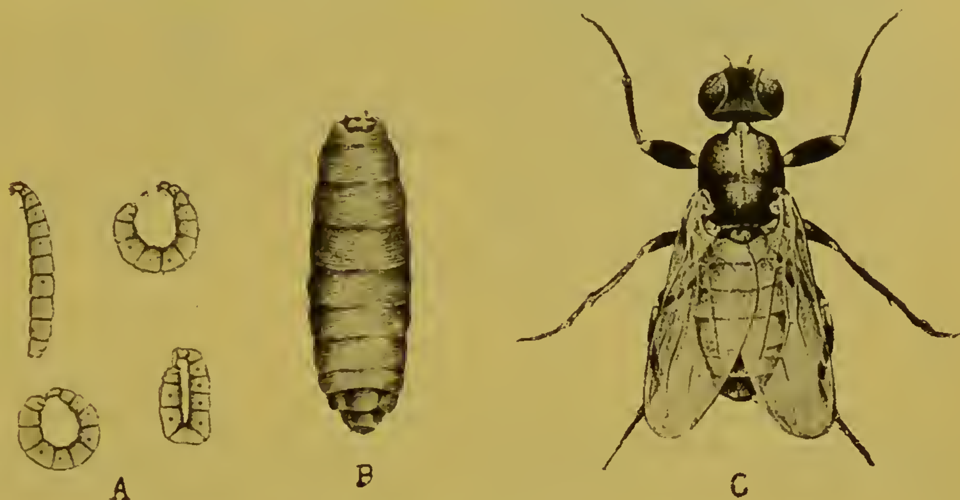


Fig. 370. — *Piophila casei*. A, larve; B, ninfa; C, femmina adulta.

La bocca è munita di due mandibole in forma di due grossi e robusti uncini neri, retrattili. Queste larve si vedono assai di frequente sul formaggio gorgonzola o sul pecorino alterato (formaggio marcetto) e spesso vengono ricercate e mangiate con una certa avidità.

Le lesioni che producono nell'intestino umano e i danni economici che possono arrecare nei depositi del formaggio sono tutt'altro che indifferenti. Infatti io ho potuto dimostrare che esse attraversano il tubo digerente dell'uomo e de' cani di esperimento senza che il loro sviluppo venga arrestato o ritardato e che nell'intestino producono lesioni di natura meccanica, consistenti nell'abrasione dell' epitelio dell' intestino, nella distruzioni di parti della mucosa, nell' infiltrazione emorragica e in iperemie più o meno intense, che son dovute con ogni probabilità all'azione degli uncini boccali e degli aculei che si riscontrano sulla faccia ventrale e che, aprendo tante vie di ingresso, possono facilitare la penetrazione dei germi patogeni.

Esse resistono a quasi tutti gli agenti fisici e chimici e solo i vapori di cloroformio e l'acqua cloroformica le uccidono istantaneamente. Una volta penetrate nello intestino umano, si possono far espellere con semplici purganti oleosi, mentre la distruzione di queste larve, che tanto danno portano all' industria dei formaggi, potrebbe facilmente ottenersi con il cloroformio, con i suoi vapori o meglio, e più economicamente, con la semplice acqua cloroformica.

DITTERI TRASMETTITORI DI MALATTIE.

a) Per inoculazione.

I Ditteri capaci di trasmettere malattie batteriche o parassitarie per inoculazione hanno un apparato boccale pungente ed appartengono a tutti tre i sotto ordini: Afanitteri, Brachiceri e Nemoceri.

1° **Afanitteri** (ἀφανής, invisibile; πτερόν, ala).

In questo sott'ordine dobbiamo considerare due famiglie, quella delle *Sarcopsillydae*, cui appartiene la *Sarcopsylla penetrans* della quale già abbiamo parlato e che vive parassita obbligata allo stato adulto, e quella delle *Pulicidae*. Esse si differenziano per i seguenti caratteri:

Testa	piccola - palpi labiali a quattro articoli - terzo articolo delle antenne anellato	*Pulicidae*
	grande - palpi labiali indistintamente articolati - terzo articolo delle antenne non anellato	*Sarcopsyllidae*

Fam. **Pulicidae.**

Nella famiglia *Pulicidae* considereremo due soli generi: *Pulex* e *Ctenocephalus*, come quelli che ci interessano maggiormente, distinti dai seguenti caratteri:

Zampe forti e spesse - ♀ con 2 setole antepigidiali (una per lato)	senza pettine al bordo inferiore della testa e bordo posteriore del protorace.	Gen. *Pulex*
	con pettine di 8 spine al bordo inferiore della testa e di 16 (8 per lato) al margine posteriore del protorace	Gen. *Ctenocephalus*

Fra le specie che possono pungere l'uomo tre hanno maggior attinenza alla patologia ed all'igiene. Di esse una appartiene al genere *Ctenocephalus*; la Pulce del cane (*C. canis* Curtis) (fig. 371) e due al genere *Pulex*; la Pulce dell'uomo (*P. irritans* Lin.) e la Pulce de' ratti (*P. cheopis* Rothschild) che diversificano dalla disposizione delle setole al bordo posteriore della testa come dalla tabella seguente:

Bordo posteriore della testa con	una setola sola - una setola preoculare al disotto dell'occhio	*P. irritans*
	più setole disposte a V - una setola preoculare avanti all'occhio	*P. cheopis*

Le Pulci depositano da 8 a 12 uova ovoidi e biancastre sia nelle pieghe della biancheria poco pulita, sia in quelle dei materassi, sia anche più frequentemente nelle fessure de' pavimenti o dei mobili, sopratutto là dove è più abbondante la polvere.

Dopo un numero variabile di giorni (48-') secondo le specie e la temperatura dell'ambiente, dall'uovo nasce una larva apode, vermiforme, con una testa distinta, provvista di due antenne e di un corno frontale caduco che le serve, secondo alcuni, per rompere il guscio dell'uovo. I pezzi boccali non sono

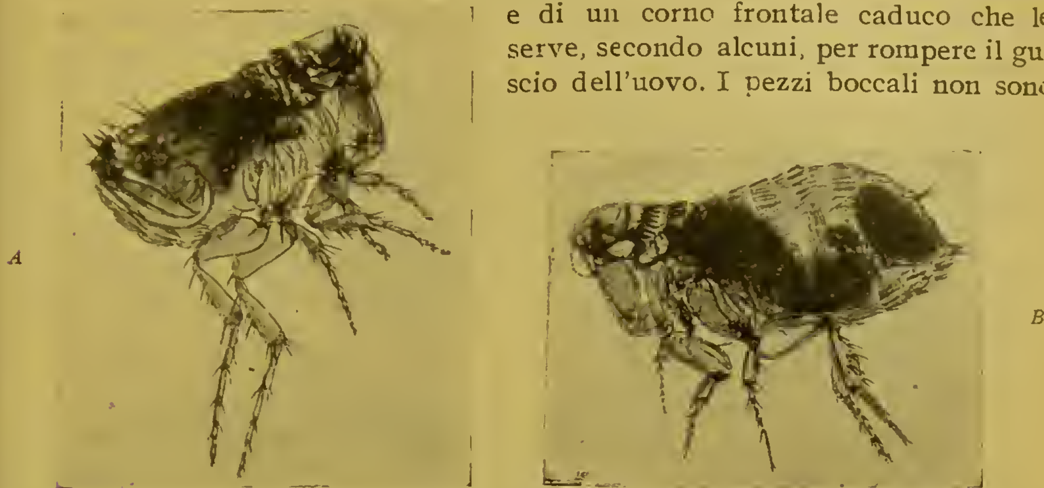


Fig. 371. — *Ctenocephalus canis. A*, maschio; *B*, femmina (dal vero).

adatti a pungere ma alla masticazione: la larva infatti si nutre solamente di detriti diversi che trova attorno a sè.

In seguito ad una muta perde il corno frontale e, raggiunto il massimo di crescenza, dopo 10-12 giorni dalla nascita, si fila una specie di bozzolo setoso entro il quale si trasforma in ninfa (fig. 372). In questo stato resta per altri 12 giorni circa, trascorsi i quali, si trasforma in insetto perfetto e subito si mette in cerca di un ospite a spese del quale possa nutrirsi. Se non lo trova subito, essa può restare assai a lungo senza nutrirsi e ciò spiega come possano trovarsi abbondanti le Pulci anche nei luoghi da lungo tempo disabitati.

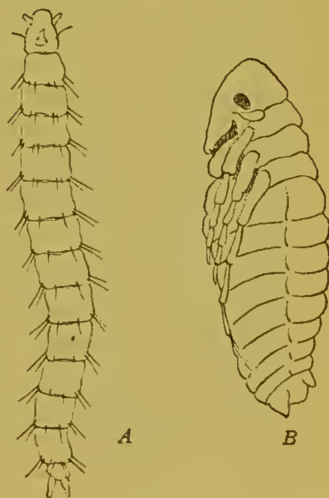


Fig. 372. — *Pulex irritans. A*, larva; *B*, ninfa.

È quindi evidente che la vita delle Pulci, ad eccezione di quella del cane, (che se questi è malato o mal tenuto può interamente compiersi in mezzo al suo pelame) si compie nell'ambiente esterno e lontano dell'ospite. Ciò porta come conseguenza che esse passano indifferentemente da un individuo all'altro ed alcune specie di Pulci, in assenza permanente o temporanea dell'ospite abituale, possono assalire anche ospiti diversi. Cosicchè noi vediamo che assai di frequente la Pulce del cane o quella del ratto si riscontrano sull'uomo e lo pungono, trasmettendogli direttamente o indirettamente malattie parassitarie (*Dipylidium caninum*) o batteriche (peste bubbonica); ad evitare le quali è necessario distruggere le Pulci stesse.

Ma la distruzione di esse costituisce un problema la cui soluzione è quasi impossibile.

Effettivamente ben poco può farsi per impedire che una Pulce giunga su

noi e purtroppo anche le persone più pulite possono esserne invase. Basta frequentare un caffè, una tramvia, una carrozza, una chiesa perchè qualcuna ci salti addosso e venga poi trasportata in casa. La lotta più efficace contro di esse è quella che mira ad impedirne la moltiplicazione nelle case stesse. Ciò può ottenersi abbastanza facilmente con la grande pulizia degli appartamenti, col lavaggio frequente dei pavimenti, seguìto dal passaggio su di essi di straccio imbevuto di petrolio; con la spazzatura accurata; col rimuovere la polvere in ogni angolo, e sopra tutto sotto i letti; con lo spolverare minuziosamente i tappeti, i quali servono assai bene di riparo e forniscono anche buon nutrimento alle larve. Inoltre bisogna evitare la convivenza coi cani ed anche coi gatti, i quali, oltre alla specie che loro è propria, possono portarci in casa assai di frequente la *Pulex irritans* e la *P. cheopis*.

2° **Brachiceri** (βραχύς, breve; κέρας, antenna).

In questo sott'ordine, caratterizzato dall'avere il corpo corto e tozzo, le antenne corte e le ali larghe, due sole famiglie comprendono specie pungenti: la famiglia *Tabanidae* e la famiglia *Muscidae*.

Fam. **Tabanidae**.

I Tafani sono Ditteri a corpo largo e testa depressa. Le ali grandi, robuste, in posizione di riposo restano un po' aperte, hanno nervature robuste e assai spesso o ci presentano macchie oppure sono alquanto affumicate. Gli occhi grandi sono assai ravvicinati nei maschi. La tromba, più o meno lunga, nelle femmine, le quali sono ematofaghe, si compone di sette pezzi (labbro inferiore o guaina della tromba, labbro superiore o epifaringe, ipofaringe, 2 mascelle e 2 mandibole), nei maschi invece, che si nutrono di succhi di fiori, le mandibole si atrofizzano ed essa risulta costituita di soli 5 pezzi.

Le antenne, di tre articoli, hanno l'ultimo conico ed anellato. Le uova fusiformi, oscure, sono deposte o in terra o sulle erbe. Le larve lunghe, cilindriche, assottigliate alle due estremità, hanno una testa retrattile, provvista di due occhi e armata di due grandi mandibole mobili e ricurve in basso; il loro corpo è costituito di 11 segmenti, ciascuno dei quali è provvisto di un numero di escrescenze variabile secondo le specie.

Le larve dei Tafani sono carnivore, vivono per la massima parte in terra, sebbene qualcuna (*T. autumnalis*) si trovi invece nelle acque. Le ninfe dei Tafani si riconoscono facilmente per avere l'ultimo segmento del corpo guarnito di sei protuberanze scagliose e per avere i margini posteriori degli altri segmenti guerniti di numerosi e lunghi peli.

I Tafani sono sparsi su tutta la superficie terrestre; ciascun clima ha le sue specie proprie. Essi vivono nei boschi e nei pascoli frequentati dal bestiame, che assalgono sopratutto nelle ore più calde. La loro avidità per il sangue è straordinaria: si gettano sugli animali con una rapidità straordinaria, li pungono, perforano con la loro tromba il cuoio più duro e malgrado l'agitarsi della bestia, lo scuotere della cute o della coda, restano immobili sino a che non siano sazi.

I Tafani pungono spesso anche l'uomo e la loro puntura assai dolorosa è, come negli animali, seguita per lo più da un discreto stillicidio di sangue.

Essi trasmettono alcune forme di tripanosomiasi nel bestiame e sembra possano anche inoculare delle malattie infettive (carbonchio, ecc.)



Fig. 373. — *Haematopota pluvialis*.

Le specie più comuni tra noi sono: il *Tabanus bovinus* L., *T. autumnalis* L., *T. morio* Latr., *T bromius* L., *T. rusticus* Fabr., grossi Tafani che vivono sopratutto nei boschi e nelle praterie e assalgono di preferenza i buoi e i cavalli, specialmente nelle ore più calde del giorno: l'*Haematopota pluvialis* (L.) (fig. 373), che vive per lo più lungo i corsi d'acqua, è specie più piccola delle precedenti dalle quali si differenzia assai facilmente per la presenza di numerose macchie fuliginose irregolari sulle ali e per i suoi occhi verdastri a riflessi purpurei: è comune sulla fine dell'estate e costituisce un vero flagello per gli animali e per l'uomo sopratutto durante le afose giornate di temporale.



Fig. 374. — *Chrysops coecutiens*.

Il *Chrysops coecutiens* (L.) (fig. 374), piccolo Tafano che assalisce sopratutto i cavalli, di preferenza attorno agli occhi. Ha le ali assai divaricate, brune, con una grossa macchia trasparente nel mezzo ed un'altra verso l'estremità; gli occhi sono verdi dorati con macchie purpuree, l'addome con la metà anteriore di un giallo fulvo chiaro. Come il precedente si rende estremamente noioso durante le giornate di temporale. Determina con la sua puntura assai spesso delle intense congiuntiviti nei cavalli, asini e muli e assai probabilmente è l'ospite intermedio e l'agente trasmettitore della *Filaria conjunctivae*. Il suo volo, al contrario di quanto avviene per gli altri Tafani, è silenzioso.

Fam. Muscidae.

Questa famiglia, che comprende senza dubbio il maggior numero di Ditteri, quelli cioè che vanno col nome di Mosche propriamente dette, è caratterizzata dall'avere le antenne corte, tozze, con il terzo articolo globoso, lenticolare, munito alla base di una setola dorsale. L'apparato succhiatore può essere costituito da una tromba molle, atta a succhiare, in cui avvenne la fusione di tutti i pezzi boccali (*Musca*), oppure essere rigido e adatto a pungere (*Stomoxys, Glossina*) : in questo caso però esso è costituito solamente da tre

soli pezzi (labbro inferiore, epifaringe ed ipofaringe): mancano le mascelle e le mandibole.

Fra le Mosche pungenti e succhiatrici di sangue tre generi e tre specie sopratutto ci interessano.

Stomoxys calcitrans (Geoffr.) (fig. 375).

È una piccola Mosca che a prima vista somiglia assai alla Mosca domestica sia per la grandezza sia per l'apparenza. Guardata con attenzione ne differisce perchè allo stato di riposo nella parte anteriore della testa presenta un piccolo dardo, orizzontale che si ripiega in basso solo al momento di pungere. Le uova e le larve si sviluppano nello stabbio di cavallo.



Fig. 375. — *Stomoxys calcitrans.*

È assai comune nell'estate, specialmente vicino alle scuderie, e, se punge abitualmente gli equini, non è raro che attacchi l'uomo. Ed infatti accade assai spesso, specialmente in campagna, di sentirsi pungere improvvisamente anche la disopra dei vestiti da una Mosca che, ritenuta per una Mosca domestica, altro non era che una *Stomoxys*. La puntura provoca un dolore acuto ma di breve durata e non lascia che un piccolo rossore, il quale sparisce ben presto.

Nell'uomo si suppone che le *Stomoxys* possano inoculare il bacillo del carbonchio nello stesso modo che si suppone avvenga per i cavalli, nei quali trasmette sicuramente una forma di filariosi ed anche una specie di tripanosomiasi.

Haematobia stimulans (Meig).

È una piccola Mosca pungente che, avida di sangue, assale sopratutto il bestiame bovino. L'uomo è anche esso sovente punto da questo insetto il quale, al contrario del precedente, vive lontano dalle scuderie in mezzo ai prati e in vicinanza di corsi d'acqua.

Glossina palpalis (Robineau-Desvoidy) (fig. 376).

È senza dubbio il principale e forse unico agente inoculatore del *Trypanosoma gambiense*, che genera la tripanosomiasi umana.

Le Glossine, o Mosche tsè-tsè, si distinguono facilmente da tutte le altre. Esse sono armate di una lunga tromba, rigida e sottile, composta di tre

pezzi (labbro inferiore, labbro superiore ed ipofaringe). Allo stato di riposo questa è tenuta orizzontalmente e i pezzi pungenti sono racchiusi dentro palpi lunghi e foggiati a semicanale, di guisa che, quando sono ravvicinati,



Fig. 376. — *Glossina palpalis* (da Austen).

costituiscono un vero astuccio chitinoso (vedi fig. 362). Le antenne hanno, come tutti i brachiceri, tre articoli, ma il terzo articolo grosso e massiccio, invece di avere uno stilo semplice, ne ha uno guarnito di numerosi peluzzi disposti a raggi i quali lo fanno somigliare ad un pettine. Le ali oltrepassano la lunghezza dell'addome e allo stato di riposo si sovrappongono come le lame d'una forbice in modo che i due bordi costali formano due linee quasi parallele. Hanno colori oscuri: il torace è di colorito grigio con macchie brune, le ali e le zampe giallo-brunastre e l'addome bruno per lo più ci presenta delle fascie e macchie fulve più o meno chiare.

I maschi si distinguono dalle femmine perchè hanno l'ultimo segmento addominale ripiegato sulla faccia ventrale, ove forma come una specie di ispessimento (ipopigio) assai visibile, inciso sulla linea mediana.

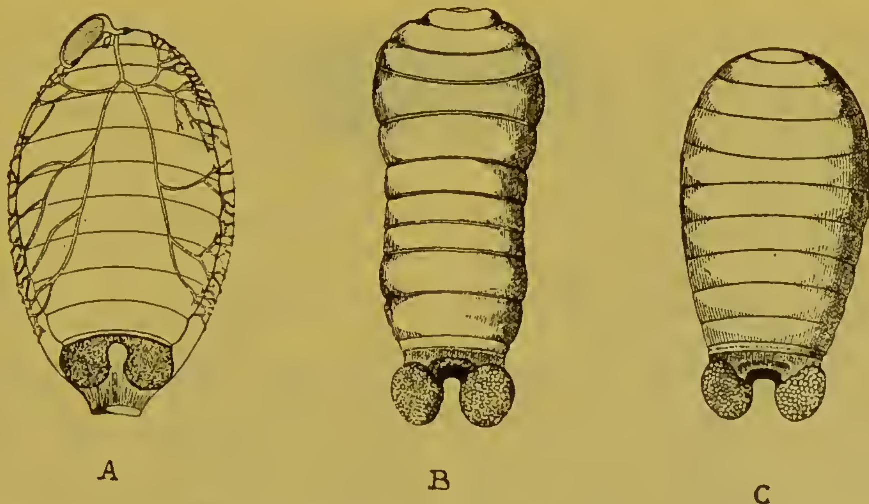


Fig. 377. — A, utero di *Glossina* che lascia scorgere nell'interno la larva; B, larva appena espulsa; C, ninfa (da Roubaud).

Le Glossine non depositano uova, ma sono vivipare. Le uova, secondo Roubaud, che si staccano dalle ovaie, cadono uno alla volta nell'ovidutto e qui dànno nascita ad una giovane larva che passa in una specie di vasto utero, ove trova l'ambiente adatto ed anche il nutrimento per proseguire nello

sviluppo. Infatti nella parte anteriore dell'utero stesso, sopra una specie di mammellone, sboccano per un condotto unico due glandole speciali che secernono un liquido lattescente. La larva, come un piccolo canguro nel marsupio, si nutre di questa sostanza e rapidamente cresce, tanto che in 3-5 giorni, dopo aver subito due mute, è espulsa dall'utero. Subito cerca un riparo o nelle fessure del suolo o sotto la corteccia d'un albero e, dopo due ore appena dall'avvenuta espulsione, la larva cessa di muoversi, i suoi tegumenti divengono oscuri e coriacei e si trasforma in ninfa (fig. 377). In questo stato resta circa un mese e la Mosca esce dalla parte anteriore dell' involucro ninfale per una specie di operculo circolare. Dopo tre settimane circa dalla nascita le femmine sono capaci di partorire la prima larva: le successive vengono deposte ogni 9 o 10 giorni.

Tanto i maschi come le femmine delle Glossine si nutrono esclusivamente di sangue. Preferiscono quello dei vertebrati a sangue caldo e sopratutto dei mammiferi, ma in assenza di questi assalgono anche i rettili. Ma dalle osservazioni del Kleine e del Roubaud sembra che il sangue di questi animali (coccodrilli e varani) non sia troppo adatto per loro, giacchè diverrebbero infeconde.

Hanno una voracità straordinaria e, se sono indisturbate, in breve tempo succhiano una tal quantità di sangue che oltrepassa due volte il peso del

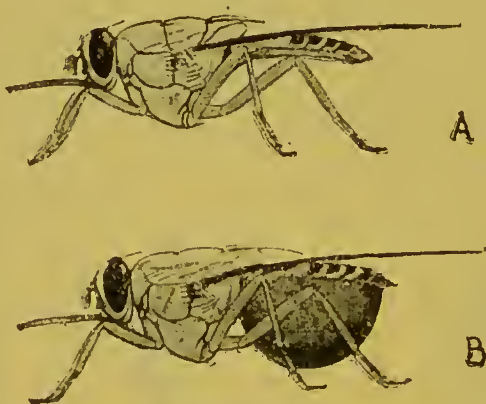


Fig. 378. — A, *Glossina* digiuna; B, sazia (da Austen).

loro corpo e cambiano completamente il loro aspetto tanta è la distensione dell'addome (fig. 378).

Le Glossine abitano le regioni umide delle regioni tropicali e sub-tropicali dell'Africa. Si riscontrano generalmente lungo il corso dei fiumi; hanno abitudini diurne, ad eccezione di una specie: la *G. longipennis* Corti, che vive nelle regioni deserte, ove, per sfuggire la siccità, si nasconde durante il giorno nei luoghi più oscuri ed umidi e esce a pungere solo la sera.

La *G. palpalis*, che si distingue dalle altre specie per avere gli ultimi due articoli de' tarsi del primo paio di zampe e tutti gli articoli tarsei del 3° paio completamente neri, ha una zona di distribuzione geografica assai vasta: è compresa all'incirca in un triangolo i cui apici sono rappresentati dal Capo Verde e Mossamedes nel versante occidentale dell'Africa e dal lago Rodolfo su quello orientale.

3° **Nematoceri** (νῆμα, filo; κέρας, corno, antenna)

Questo sott'ordine comprende quei Ditteri che hanno le antenne lunghe, filiformi, il corpo allungato, le zampe sottili e le ali strette e lunghe.

Vi si comprendono parecchie famiglie che si distinguono per i seguenti caratteri:

- Corpo
  - ricoperto da grossi e lunghi peli - ali larghe vellutate con 9-11 nervature longitudinali - tromba corta rigida . . . . *Psychodidae*
  - non peloso
    - nervature longitudinali e bordo interno delle ali coperte da scaglie - tromba lunga - zampe lunghe . . . . *Culicidae*
    - nervature longitudinali delle ali senza scaglie
      - antenne corte di 11 articoli, non coperte da lunghi peli - ali larghe - dorso ricurvo - zampe corte . . . . *Simulidae*
      - antenne lunghe, sottili, di 13 articoli, pelose - nervature delle ali assai marcate presso il bordo costale - zampe lunghe . . . . *Chironomidae*

1° Fam. **Simulidae.**

È rappresentata da quei Moscerini che hanno il dorso ovale e assai ricurvo, gli occhi riuniti sulla linea mediana nei maschi: le antenne cilindriche corte con peli scarsi e composte di undici segmenti più larghi che lunghi: le ali larghe con la nervatura marginale che non oltrepassa l'apice. La tromba è corta, robusta.

Le larve sono acquatiche: si tengono attaccate alle pietre o alle piante di guisa che si trovano abbondanti nei ruscelli a corso rapido e sopratutto dove esistono piccole cascate, in una parola là dove, per il gorgoglio delle acque, l'ossigeno dell'aria può giungere facilmente alle larve stesse, che relativamente sono immobili.

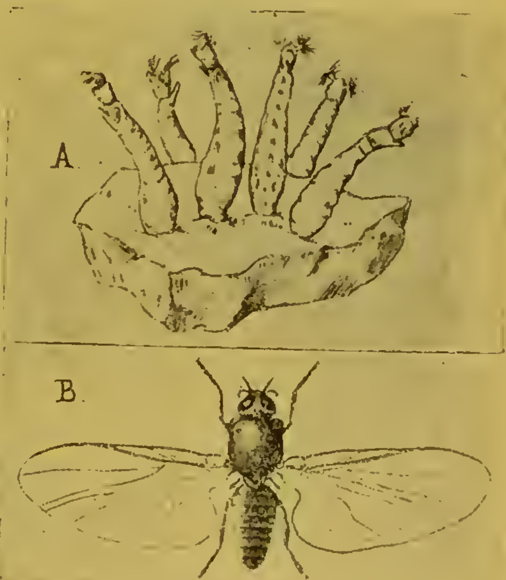


Fig. 379. — *Prosimulium reptans*. A, larve (da Blanchard); B, femmina adulta (da Austen).

Prima di trasformarsi in ninfa la larva segrega un specie di bozzolo con apertura superiore dalla quale esce un pennacchio di sifoni respiratori.

Gli adulti, ematofagi, specialmente le femmine, cominciano a comparire verso la primavera ed attaccano gli animali e l'uomo producendo una puntura assai dolorosa.

Fra noi comunissimo è il *Prosimulium reptans* (L.) (fig. 379) al quale il Sambon vorrebbe attribuire un'azione sia come insetto trasmettitore, sia come ospite dell'agente specifico della pellagra. Questa ipotesi però, non ancora avvalorata da fatti sperimentali, non può reggere, a mio avviso, perchè, secondo quanto io stesso ho potuto osservare, in Italia non vi è un rapporto costante fra la distribuzione topografica della pellagra e quella del *Prosimulium*.

2° Fam. **Chironomidae.**

I rappresentanti di questa famiglia somigliano alle comuni Zanzare, dalle quali si differenziano per la brevità della tromba e per l'assenza di scaglie. Vivono nelle regioni umide e le larve lunghe, delicate e biancastre si rinvengono per lo più in mezzo alle foglie e rami d'albero marciti. Si conoscono più generi e specie tutte capaci di pungere dolorosamente l'uomo, ma nulla si sa circa la loro azione patogena. Comuni fra noi sono sopratutto il *Mycteropus Bezzii* ed il *Mycteropus irritans* Noè, i quali pungono l'uomo principalmente in giugno e luglio e spariscono in agosto,

3° Fam. **Psychodidae.**

In questa famiglia la sola specie che punge l'uomo è il *Phlebotomus papatasii* Scopoli, chiamato volgarmente Pappataci o Serapica (fig. 380). Questo piccolo Dittero di colorito grigio chiaro a riflessi argentei, ha un rivestimento di peli lunghi e sottili che ricopre con una peluria il corpo e le ali in guisa da farle somigliare ad una piccola farfalla notturna.



Fig. 380. — *Phlebotomus papatasii.*

Esso punge di notte: la puntura è assai più dolorosa di quella delle Zanzare.

Sembra che il *Phlebotomus* inoculi, pungendo, quella *febbre da Pappataci, febbre di tre giorni* o *febbre di estate* la quale, secondo alcuni, sarebbe la stessa entità morbosa dell'altra malattia che va col nome di *Dengue*, sebbene in realtà differiscano alquanto fra di loro.

I Pappataci, assai comuni in Italia, si riscontrano in tutta l'Europa meridionale e in molte regioni dell'Africa e dell'Asia, e di recente il Tiraboschi lo ha segnalato nell'America meridionale (Brasile-Parà).

Essi hanno abitudini notturne e durante il giorno stanno di preferenza attaccati alle pareti delle chiaviche e delle cantine oscure e mal tenute. Le larve cilindriche e con un corto tubo respiratorio vivono nelle materie escrementizie e in mezzo alle sostanze vegetali in macerazione.

4° Fam. **Culicidae.**

Gli insetti che si comprendono in questa famiglia presentano dal punto di vista del medico-igienista una importanza straordinaria. Essi vanno comunemente col nome di Zanzare e presentano i seguenti caratteri:

Corpo sottile slanciato. Antenne filiformi, lunghe, pluriarticolate, guarnite di peli sopratutto nei maschi. Tromba lunga, diretta per lo più allo innanzi, adatta per pungere e succhiare. Torace gibboso. Addome sub-cilindrico, allungato. Zampe lunghe, sottili. Ali delicate trasparenti.

Hanno metamorfosi completa: dall'uovo cioè nasce una larva che si trasforma poi in ninfa, dalla quale nasce l'insetto perfetto o *imagine*.

Le larve e le ninfe sono acquatiche. L'insetto perfetto vola e mentre i maschi si nutrono esclusivamente di succhi vegetali le femmine della maggior



Fig. 381. — Forme tipiche di scaglie (schematiche).

parte delle specie si nutrono anche del sangue di mammiferi, uccelli o rettili, pesci, ecc.

Il corpo di una Zanzara è coperto di scaglie, di peli e di setole. Le prime (fig. 381) sono assai variabili di forma e possono raggrupparsi nei tipi seguenti:

Scaglie	ricurve	falciformi (1)
		piliformi (2)
	diritte	forcute (3-4)
		tortuose (5)
		lanceolate (6)
		espanse (7)
		fusiformi (8)
		piatte (9)
		irregolari (10)

Si distribuiscono diversamente sulle varie parti del corpo stesso, infatti:

La testa è coperta da tre forme di scaglie falciformi, piatte e forcute.

Il torace ha scaglie falciformi, piliformi, fusiformi, piatte, tortuose.

L'addome per lo più è coperto di scaglie piatte sovrapposte per lo più come le tegole di tetti.

Nelle ali sulle nervature vi sono scaglie che variano assai da genere a genere; sul bordo esistono piccole scaglie piatte, mentre la frangia è costituita da scaglie lanceolate di varia grandezza.

Le zampe della maggior parte di Culicidi sono fornite di scaglie piatte.

Testa. — È arrotondata e lateralmente porta due occhi sfaccettati, grossi a mezzaluna, con riflessi metallici.

Essi vengono quasi a toccarsi sulla linea mediana dorsale e ventrale.

La parte dorsale della testa, ove gli occhi quasi si toccano, prende il nome di *vertice*, il quale ha anteriormente e posteriormente due spazii triangolari che prendono rispettivamente i nomi di *fronte* e di *occipite*.

Questo si continua in basso con la *nuca*, quello all'innanzi con un pezzo chitinoso che prende il nome di *clipeo*.

Nella faccia inferiore gli spazi compresi fra gli occhi e il collo prendono il nome di *guancie*.

Alla fronte si articolano le *antenne* (organi sensoriali) (fig. 382) per mezzo di un pezzo basale arrotondato, ombellicato e sprovvisto di peli: ad esso seguono 13-14 segmenti allungati, ciascuno dei quali porta scarsi e corti peli nelle femmine, numerosi e lunghi nei maschi. Questo corattere permette quindi di poter distinguere subito anche ad occhio nudo i maschi dalle femmine.

Fig. 382. — Appendici e pezzi boccali che si articolano alla testa di una Zanzara. A, antenne; P, palpi; GT, guaina della tromba; L, labbro inferiore; I, ipofaringe; MA, mascelle; MD, mandibole.

La porzione anteriore della testa si prolunga in una specie di proboscide o *tromba* che è l'organo boccale. Esso nelle femmine è composto di sette pezzi:

1° Il *labium* o *guaina della tromba* (fig. 382 GT), che rappresenta il labbro inferioreallungato, ha forma di una doccia scanalata con apertura superiore e termina in due piccoli lobi laterali, *labelli*, mobili, fogliformi. Il *labium* non prende parte alla puntura, ma, mentre nello stato di riposo serve a proteggere e contenere gli altri sei pezzi boccali, quando l'animale punge, a misura che questi si infossano nello spessore della pelle, esso si incurva e si ripiega su sè stesso.

2. Il *labrum* (epifaringe, labbro superiore). È anche esso scanalato, ma in senso inverso del precedente ossia con apertura inferiore. La sua estremità anteriore è tagliata obliquamente e termina con tre punte di cui la mediana è più corta.

3° L'*ipofaringe* è situato immediatamente sotto al precedente e lo chiude perfettamente quando vi si addossa venendo a costituire in questo modo un vero tubo entro il quale scorre il sangue aspirato. Esso è costituito da una sottile lamina chitinosa con un ispessimento mediano longitudinale, nel cui centro si trova il canale salivare.

4° Due *mandibole* anche esse lamellari, sottilissime che terminano con una dilatazione leggermente denticolata.

5° Due *mascelle* lamellari a bordo interno alquanto ispessito e con estremità aguzza e fortemente seghettata.

Nei maschi l'apparato boccale è ridotto: in essi mancano le mascelle e l'ipofaringe è saldato al labbro inferiore.

Un po' dorsalmente ed ai lati della base della tromba si trovano i *palpi mascellari*, organi di senso Essi sono composti da un numero variabile di articoli ed hanno una lunghezza assai variabile non solo secondo i vari generi e le varie specie, ma anche secondo il sesso.

Torace. — È costituito da tre segmenti fusi fra loro (*protorace, mesotorace* e *metatorace*) ciascuno dei quali alla sua volta per mezzo di suture trasversali si divide in altre tre porzioni dorsale, laterale, ventrale che prendono il nome di *tergum*, *pleurae* e *sternum* (fig. 383).



Fig. 383. — Torace di zanzara (schema).

Il *protorace* (fig. 384) è assai ridotto, la sua parte superiore costituisce un breve collo: lateralmente si vedono due piccoli lobi mobili

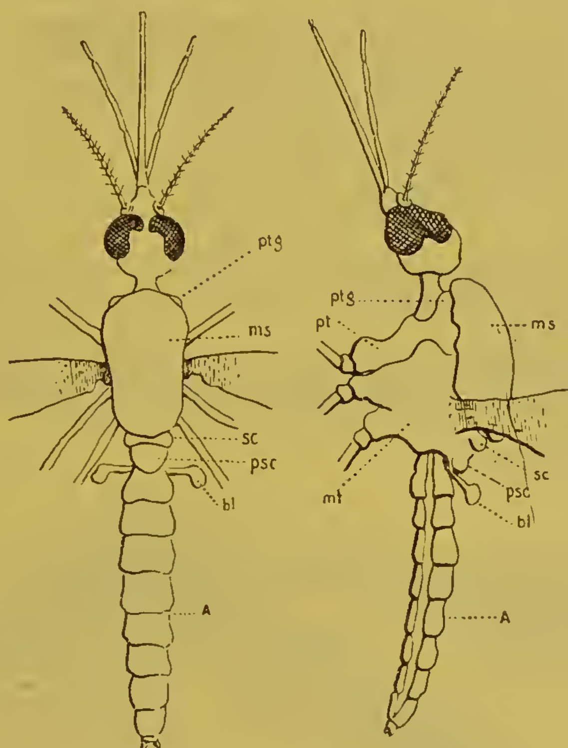


Fig. 384. — Anatomia esterna di una Zanzara.

(*patagia*) (*ptg*) e ventralmente una più ampia superficie sternale (*pt*) cui si articola il primo paio di zampe.

Il *mesotorace* è molto più sviluppato. La parte più grande, gibbosa, che prende il nome di torace propriamente detto, cuopre le altre parti: è costituita dal *tergum* (*ms*), presso i margini posteriori del quale dalle *pleure* si originano le ali, mentre che dallo *sternum* si stacca il secondo paio di zampe.

Il *metatorace* è assai ridotto: ha la parte anteriore del *tergum*, coperta dallo *scutellum* (*sc*) (banderella chitinosa trasversale che segue immediatamente il mesotorace) e la parte posteriore (*psc*) (*post-scutellum* o *metanotum*) che

si protende sul primo segmento addominale. Inoltre ci presenta sui fianchi due appendici mobili a forma di bacchetta di tamburo (*bl*) *bilancieri* o *altere*, e ventralmente l'origine del terzo paio di zampe.

Ali. — Sono strette, lunghe, trasparenti e si sovrappongono completamente all'addome che oltrepassano nello stato di riposo. La loro membrana è coperta per lo più da scaglie che possono riunirsi anche in ammassi, in modo da dare all'ala un aspetto più o meno macchiato caratteristico, ed è rinforzata e mantenuta in forma costante da ispessimenti chitinosi chiamati *nervature* o *vene*.

Le ali aperte ci presentano un bordo anteriore diritto, rigido, spesso, ed un bordo esterno e posteriore guarnito da una frangia formata da scaglie allungate. Questo bordo posteriore avvicinandosi alla base dell'ala ci presenta una profonda incisura (*incisura ascellare*) alla quale segue un lobulo alare (*alula*) che si continua poi in un secondo lobulo (*squama*) per mezzo del quale avviene l'inserzione al torace.

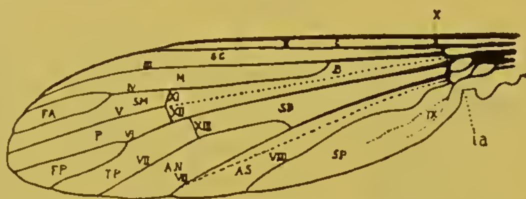


Fig. 385. — Ala di Zanzara.

Gli spazi della membrana alare, compresi fra le nervature, prendono il nome di *cellule* (fig. 385).

Si hanno in complesso tredici nervature (9 longitudinali, 4 trasverse) e tredici cellule disposte come nella figura e così denominate:

Nervature.

I - Costale.
II - Ausiliare.
III - Prima longitudinale.
IV - Seconda »
V - Terza »
VI - Quarta »
VII - Quinta »
VIII - Sesta »
IX - Settima o falsa longitudinale.
X - Trasversa omerale.
XI - Trasversa soprannumeraria.
XII - Trasversa media.
XIII - Trasversa posteriore.

Cellule.

1ª - Costale (C).
2ª - Sottocostale (SC).
3ª - Marginale (M).
4ª - Prima sottomarginale o a forchetta anteriore (FA).
5ª - Seconda sottomarginale (SM).
6ª - Prima posteriore (P).
7ª - Seconda posteriore o a forchetta posteriore (FP).
8ª - Terza posteriore (TP).
9ª - Prima basale (B).
10ª - Seconda basale (SB).
11ª - Anale (A).
12ª - Ascellare (AS).
13ª - Spuria (SP).

Zampe. — Sono lunghe, sottili, fragilissime (fig. 386). Le più grandi sono le posteriori, poi le medie e poi le anteriori, che sono più piccole. Sono costituite di nove pezzi: *anca* (A) che si attacca al torace; *trocantere* (T); *femore* o *coscia* (F); *tibia* (Ti) e *tarso* (Ta, I, II, III, IV, V) composto di 5

segmenti l'ultimo dei quali è munito di due *unghie* (che possono essere semplici, unidentate o bidentate), di due *pulvilli* (lobi che sono guarniti di pliche e peli rigidi e che servono per aderire ai corpi lisci) e di un *pezzo penniforme* impari.

Addome. — (Fig. 384, A). Allungato, pieghevole comprende nove segmenti. Il primo o anteriore più corto degli altri si articola al metatorace: gli altri sono più allungati e l'ultimo porta l'armatura genitale che nel maschio è formata da due grossi lobi laterali, forniti di setole e peli, che costituiscono una robusta pinza e nella femmina da due piccoli lobi, anche essi laterali, i quali nascondono un pezzo impari mediano (*oviscatto*).

Organizzazione interna (fig. 387). — Quello che più interessa il medico dell'organizzazione interna delle Zanzare è senza dubbio il sistema digerente. Al tubo aspiratore che, come abbiamo detto, è costituito dal labbro superiore e dall'ipofaringe, ravvicinati, segue un rigonfiamento a sezione triangolare (*faringe*) (F) che occupa la porzione posteriore della testa. Esso è l'organo destinato a produrre l'aspirazione. Muscoli potenti, che si impiantano con uno degli estremi all'occipite e ai lati della testa, con l'altro si attaccano al faringe, contraendosi e rilasciandosi aumentano o diminuiscono la capacità del faringe e producono la suzione.

Dirigendosi all'indietro e in alto il faringe, in corrispondenza del collo, si restringe e subisce una ripiegatura che forma un angolo quasi retto.



Fig. 386. — Zampa di Zanzara.

In questo punto la sua parete ci presenta una plica che fa ufficio di valvola. Da qui comincia l'*esofago* (E) propriamente detto, il quale, giunto

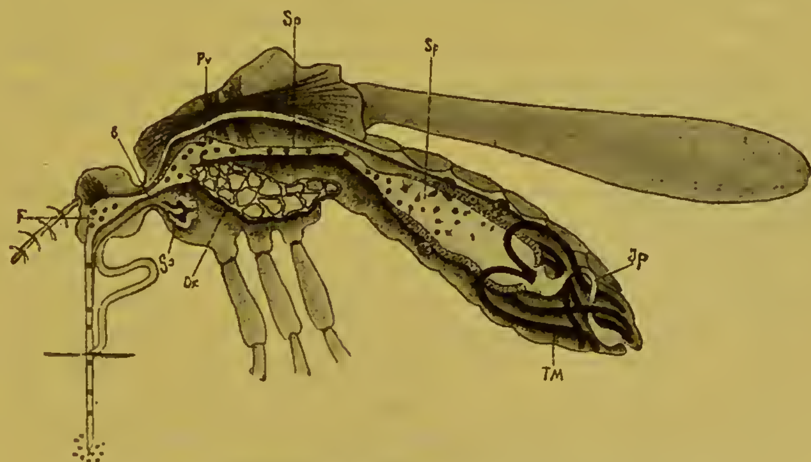


Fig. 387. — Organizzazione interna di Zanzara e modo di puntura.

in corrispondenza del torace si dilata alquanto, mandando due o tre diverticoli, di cui uno più grande degli altri, situato a sinistra e in basso, comunicante con l'esofago per un piccolo canale, si vede per lo più ripieno di grosse bolle d'aria.

Esso prende vari nomi, *sacco aereo, gozzo, diverticolo esofageo, stomaco succhiatore,* ecc. ecc. (De). Il faringe, l'esofago ed i diverticoli esofagei costituiscono l'*intestino anteriore.*

L'esofago dopo aver ricevuto lo sbocco di questo diverticolo penetra nell'*intestino medio* come il turacciolo in una bottiglia, il cui collo si presenti alquanto dilatato ed ispessito. Questo ispessimento che prende il nome di *proventricolo* (Pv) è ricco di fasci muscolari e sembra che abbia funzioni di valvola.

Ad esso segue la parte anteriore dello stomaco (*collo dello stomaco*) (Sa) lunga e ristretta. Questa, oltrepassato il torace va man mano slargandosi e si continua con una parte assai dilatata (*stomaco propriamente detto* o *ventricolo chilifero*) (Sp) che occupa quasi tutto l'addome.

All'indietro, per mezzo d'una apertura (*piloro*), comunica con l'*intestino posteriore* (Ip). Subito dopo questa apertura esiste una dilatazione provvista di scarse fibre muscolari (*diverticolo del piloro*) all'origine della quale sboccano cinque tubi escretori, *tubi di Malpighi* (TM). In seguito l'intestino ha un tratto ascendente (*ileo*) piuttosto ristretto e poi si ripiega in basso e si dilata gradualmente (*colon*) fino a che, restringendosi di nuovo, torna a dilatarsi e corre quasi orizzontale fino all'ano, costituendo la porzione terminale che prende il nome di *retto*, nel cui interno si notano sei rigonfiamenti chiamati *glandole* o *papille rettali.*

Come appendice del canale digerente oltre i tubi del Malpighi esistono le *glandole salivari* (Gs). Sono in numero di due situate lateralmente e ventralmente nella porzione anteriore del torace in modo che i tre lobi principali, da cui esse sono formate si dispongono uno sull'altro secondo un piano verticale. I due lobi laterali sono più lunghi e più grandi e di struttura diversa dal mediano, il quale è più piccolo e sembra avere funzione di glandola velenifera. Ciascun lobo è percorso internamente da un dotto escretore. I tre dotti poi si riuniscono in un canale veleno-salivare che percorre il collo indipendentemente da quello dell'altra glandola, col quale però si fonde in corrispondenza della testa, formando così un dotto comune che cammina sotto al tubo digerente fra i muscoli dilatatori inferiori del faringe e sbocca nell'ipofaringe, dopo aver subìto una lieve dilatazione (*ricettacolo salivare*).

Le Zanzare sono distribuite in tutto il mondo dal 70° di latitudine nord al 50° di latitudine sud; più abbondanti però vivono nelle regioni tropicali, ove si riscontrano in tutte le stagioni; divengono più rare quanto più si va verso le regioni fredde, ove compaiono solo durante la stagione calda. Poco si allontanano dal luogo ove nacquero, però possono essere trasportate a distanza o dalle correnti aeree od anche coi mezzi di trasporto più comuni, vagoni ferroviari, carrozze, carri di fieno, erba, ecc.

Hanno abitudini crepuscolari e notturne: difficilmente pungono in pieno giorno, sebbene, secondo alcuni (Brumpt), il primo pasto, dopo la nascita, possa compiersi di giorno ed anche in pieno sole.

Ad eccezione della *Stegomyia calopus*, i cui maschi possono occasionalmente pungere, nelle altre specie solo le femmine sono ematofaghe, mentre quelli si nutrono del succo dei fiori e dei frutti.

Quando una femmina si appresta a pungere si posa sulla vittima, applica i labelli sulla pelle che viene incisa dai pezzi taglienti. Intanto mentre

questi, tenuti stretti in un sol fascio dai labelli stessi, penetrano nello spessore di essa, il labbro inferiore rimasto al di fuori si ripiega su sè stesso formando un angolo tanto più ristretto quanto più gli altri pezzi boccali si insinuano nella pelle. Una volta penetrativi, il labbro inferiore e l'ipofaringe ravvicinati l'un l'altro restano immobili, mentre le mandibole e le mascelle con i loro movimenti allargano la ferita e aumentano lo stillicidio del sangue che viene aspirato.

Contemporaneamente la zanzara contrae la glandola salivare e ne fa uscire il contenuto, il quale attraversando il canalicolo che si trova nello spessore dell'ipofaringe, va ad aumentare l'iperemia locale e ad impedire la coagulazione del sangue stesso.

Una Zanzara normalmente è ripiena dopo 1-2 minuti di succhiamento.

La fecondazione avviene generalmente poco dopo la nascita. I maschi muoiono dopo l'accoppiamento, le femmine invece hanno una vita più lunga, durante la quale si nutriscono più volte di sangue. Quando le uova sono giunte a maturità la zanzara cerca un luogo adatto per il parto.



Fig. 388. — Larva di *Anopheles* (dal vero).

Generalmente, dopo che questo è avvenuto, la femmina muore. Però ove il parto non si compia nella stagione propizia e sopraggiungano i primi freddi, le femmine fecondate si nascondono nelle grotte, nelle scuderie, nei cavi degli alberi, ove restano in letargo e attendono la primavera per riprendere le loro abitudini ed assicurare il prodotto della fecondazione.



Fig. 389. — Larva di *Culex* (dal vero).

Le *uova*, variabili per forma e per il modo con cui vengono deposte alla superficie delle acque, si schiudono, se la temperatura è favorevole, in due o tre giorni. Questo periodo può prolungarsi se la temperatura si abbassa.

Le *larve* sono metapneuste, hanno cioè le aperture respiratorie (stigmi) nella parte posteriore del corpo. Gli stigmi o si aprono direttamente sulla superficie dorsale del penultimo segmento dell'addome (*Anopheles*) (fig. 388), oppure sboccano all'apice di un tubo respiratorio (*Culex*, *Stegomyia*) più o meno lungo (fig. 389).

La presenza o no di questo sifone respiratorio costringe le larve a tenersi nello stato di riposo in una posizione caratteristica (obliqua o parallela) per rispetto alla superficie delle acque, ciò che costituisce un'importante carattere differenziale por la diagnosi de' varî generi.

Non tutte le specie possono vivere ugualmente bene in ogni acqua. Le larve degli Anofelini preferiscono le acque limpide a lento corso, quelle invece dei Culicini (*Culex, Stegomyia*) vivono in tutte le acque, ma più specialmente in quelle stagnanti, cosicchè le possiamo rinvenire tanto nei fossati come nelle pozzanghere, nelle botti, nelle scatole o nei rami d'albero dove si sia raccolta una certa quantità d'acqua.

Le larve sono vivacissime ed assai voraci. Il loro nutrimento consiste nelle sostanze vegetali od anche nei piccoli esseri animali nuotanti nelle acque stesse.

Trascorsi 12-15 giorni dalla nascita, dopo aver subito delle mute, la larva cessa di nutrirsi e si trasforma in ninfa.

Le *ninfe* dei Culicidi sono assai rassomiglianti fra di loro: hanno l'aspetto di una virgola, formata cioè da una porzione globosa (testa e torace) seguìta da una specie di appendice caudale (addome). Sul torace si notano due tubi respiratori, la forma dei quali serve sopratutto a stabilire la diagnosi generica.

Le ninfe, dopo aver nuotato assai vivacemente alla superficie delle acque per tre, quattro od anche più giorni, secondo la temperatura, si trasformano in insetto perfetto. Esse divengono dapprima immobili, poi l'addome si distende, la porzione toracica si squarcia e dall'apertura esce prima il torace, poi la testa, le zampe e le ali dell'adulto (fig. 390).



Fig. 390. — Zanzara adulta che esce dall'involucro ninfale (dal vero).

Questo, con le zampe poggiate alla superficie dell'acqua, attende che le ali si sieno distese e disseccate per spiccare il volo.

Dal punto di vista della sistematica la famiglia *Culicidae* si suddivide in più sottofamiglie, due delle quali, *Culicinae* ed *Anophelinae*, interessano a noi. Esse si distinguono per i caratteri seguenti:

Palpi	più lunghi della tromba nei ♂; assai più corti nelle ♀ .	*Culicinae*
	lunghi quanto la tromba nei ♂ e nelle ♀	*Anophelinae*

Molti sono i generi e moltissime le specie che si annoverano in queste due sottofamiglie, ma, sia perchè non appartengono alla nostra fauna, sia perchè la loro azione come agenti inoculatori di malattie non è ancora ben definita, mi limiterò solo a dare schematicamente i caratteri di quelli che ne interessano in modo speciale e precisamente del genere *Culex* e *Stegomyia*, che appartengono alla sottofamiglia *Culicinae*, e del genere *Anopheles*, tipo della sottofamiglia *Anophelinae*.

Ciascun genere, in qualunque fase di sviluppo si trovi, ha dei caratteri proprî che possono riassumersi nella seguente tabella;

Uova (fig. 391).

Culex.

Allungate, ovalari, liscie con una estremità conica, l'altra rotondeggiante: a questa aderisce un corpo globulare chiaro, trasparente (*micropilo*).

Sono disposti con l'asse maggiore perpendicolarmente alla superficie delle acque e per lo più agglutinati in ammassi a forma di barchetta con il micropilo in basso.

Misurano mm. 0.7 × mm. 0.16.

Si rinvengono in tutte le acque stagnanti.

Stegomyia.

Irregolarmente ovali. La loro superficie è uniformente coperta di cellule che racchiudono bolle d'aria, le quali permettono all'uovo di galleggiare. Sono deposte isolatamente.

Misurano mm. 0.55 × mm. 0.17.

Si rinvengono in tutte le acque stagnanti anche quando queste siano in piccola quantità.

Anopheles.

Elittiche con una delle due estremità leggermente più ottusa a forma di barca. La faccia superiore è meno convessa dell'inferiore. Lateralmente alla linea mediana superiore si dipartono due membrane a ventaglio striate trasversalmente che vanno ad occupare il terzo medio del fianco e si protendono alquanto sulla faccia inferiore. Queste due membrane che contengono delle cellule piene di aria costituiscono l'*apparato idrostatico*. Per la presenza di questo le uova nuotano come una barca con l'asse maggiore parallelo alla superficie dell'acqua.

Sono deposte isolatamente e, ravvicinandosi l'un l'altra, assumono le più svariate disposizioni (a stella, a triangolo, a poligono, a nastro, ecc.).

Misurano mm. 0.6 — 1 × 0.16 mm.

Si rinvengono nelle acque chiare, ricche di vegetazione, esposte al sole, vicino alla riva, in mezzo alle erbe e son difficili a scorgersi.

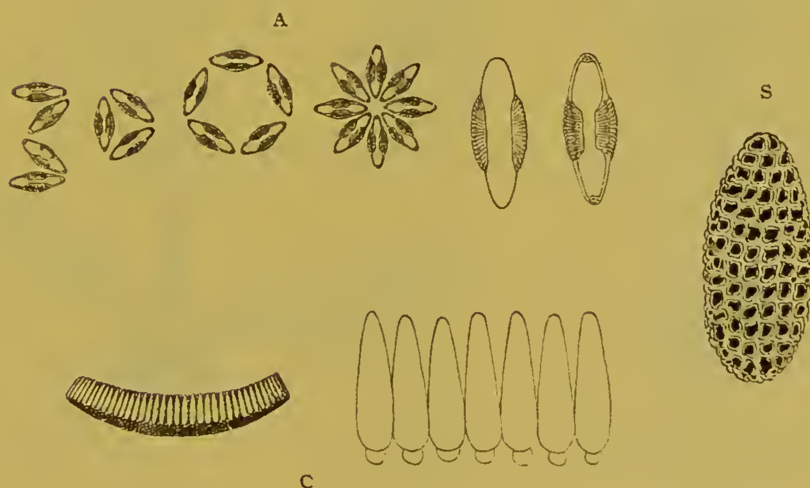


Fig. 391. — Uova di *Anopheles* (A), di *Culex* (C) e di *Stegomyia* (S).

Larve (fig. 392).

Le trachee sboccano all'apice di un lungo e sottile sifone respiratorio che, staccandosi dall'ottavo segmento addominale, forma

Le trachee sboccano all'apice di un sifone respiratorio che è proporzionalmente più corto e più largo di quello dei Culex. La larva

Le trachee sboccano direttamente sulla faccia dorsale dell'ottavo segmento addominale. Manca il sifone respiratorio, per cui la

CULEX.	STEGOMYIA.	ANOPHELES.
un angolo più o meno ottuso con l'asse del corpo. La larva per respirare si tiene quindi obliquamente con la testa in basso e l'asse del suo corpo forma un angolo acuto con la superficie dell'acqua.	si tiene obliquamente alla superficie delle acque.	larva galleggia alla superficie dell'acqua con l'asse del corpo orizzontale e parallelo a questa.

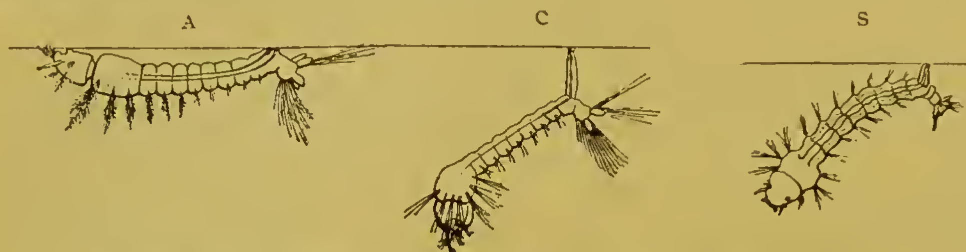


Fig. 392. — Larve di *Anopheles* (A), di *Culex* (C) e di *Stegomyia* (S).

Ninfe (fig. 393).

Massa cefalo-toracica compressa lateralmente, tozzo-corta (*Ninfa brachicefala*). Si tengono alla superficie delle acque in modo che l'asse maggiore della massa cefalo-toracica	Massa cefalo-toracica compressa lateralmente, corta, tozza (*Ninfa brachicefala*). L'asse maggiore della massa cefalo-toracica forma un angolo con la superficie delle acque.	Massa cefalo-toracica compressa lateralmente, allungata. (*Ninfa dolicocefala*). L'asse maggiore della massa cefalo-toracica è quasi parallelo alla superficie dell'acqua.



Fig. 393. — Ninfe di *Culex* (C), di *Stegomyia* (S) e di *Anopheles* (A).

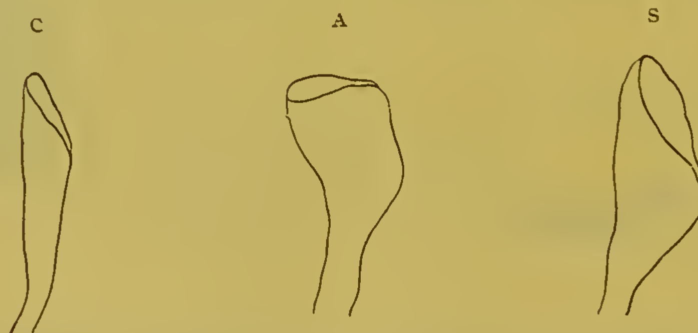


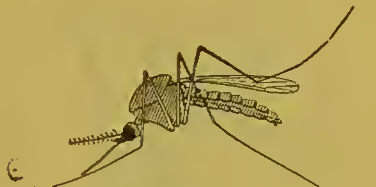
Fig. 394. — Sifoni respiratori di ninfe di *Culex* (C), di *Anopheles* (A) e di *Stegomyia* (S).

o è perpendicolare o forma un angolo colla superficie dell'acqua. Sifone lungo, stretto, con apertura rimiforme, situato all'estremità posteriore del torace (fig. 394 *C*).	Sifone triangolare situato verso il mezzo del torace (fig. 394 *S*).	Sifone corto slargato all'estremità, che è tagliata in linea retta, e posto sul mezzo del torace (fig. 394 *A*).

Adulti.

a) *Posizione su di un piano allo stato di riposo* (fig 395).

CULEX.	STEGOMYIA.	ANOPHELES.
La tromba e l'addome formauo un angolo con l'asse del torace, le due estremità sono prossime al piano. L'iusetto aderisce per lo più con tutte sei le zampe.	La tromba e l'addome formano un angolo con l'asse del torace. Le due estremità sono prossime al piano di adesione. L'ultimo paio di zampe è tenuto in alto, i tarsi ricurvi sono continuamente agitati.	La tromba, il torace e l'addome cadono sullo stesso asse che forma un angolo col piano di adesione. L'ultimo paio di zampe per lo più è tenuto sospeso in alto.



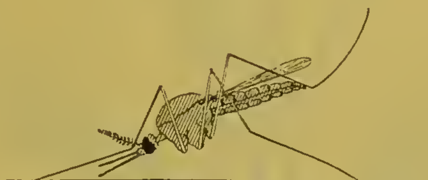


Fig. 395. — Posizione di *Culex* e *Stegomyia* (C) e di *Anopheles* (A) allo stato di riposo.

b) *Ali.*

Per lo più prive di macchie o con macchie poco distinte.	Senza macchie.	Con macchie assai appariscenti (ad eccezione dell'*A. bifurcatus*).





Fig. 396. — Palpi di *Culex*.

c) *Palpi.*

Nei maschi più lunghi della tromba. Nelle femmine assai corti, di tre articoli (fig. 396).	Nei maschi oltrepassano di poco la tromba. Nelle femmine [assai corti, di quattro articoli.	Nei maschi lunghi quasi quanto la tromba. Nelle femmine lunghi quasi quanto la trouiba (fig. 397).

d) *Scutello.*

CULEX.	STEGOMYIA.	ANOPHELES.
Trilobato.	Trilobat .	Semplice non trilobato.

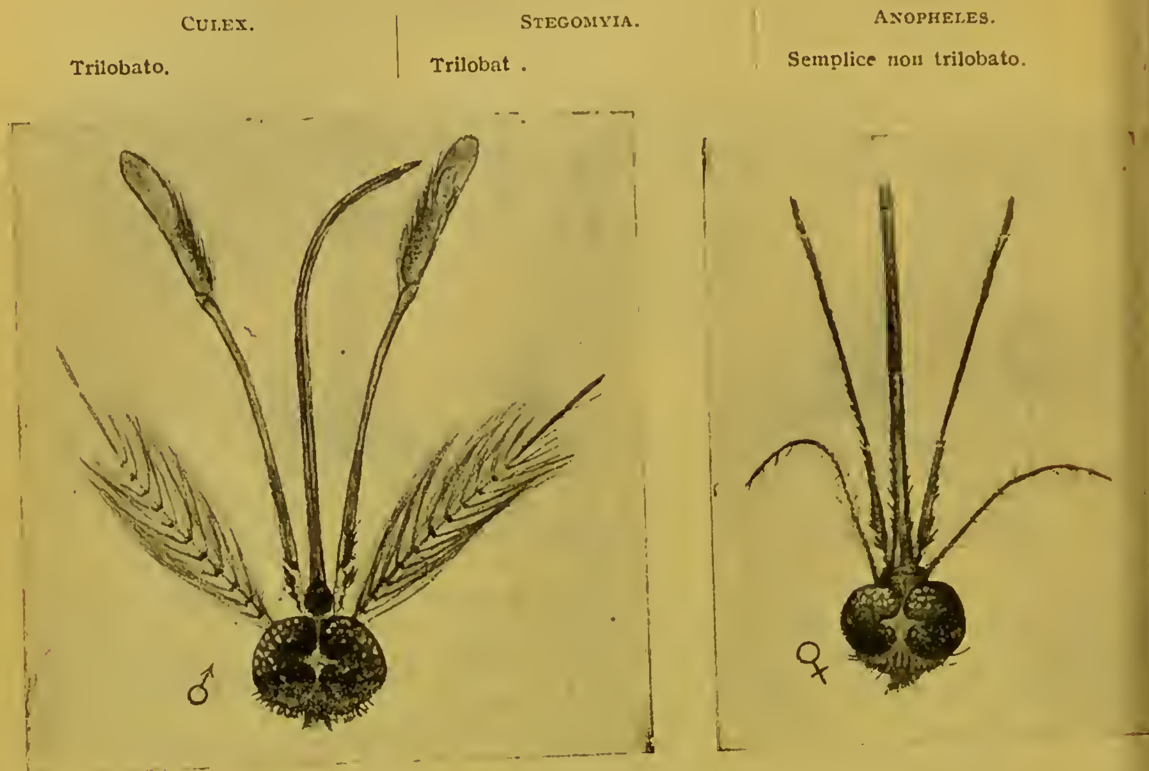


Fig. 397. — Palpi di *Anopheles.*

Il genere *Culex* L. è rappresentato da numerose specie, di cui la più nota e più diffusa è senza dubbio il *Culex pipiens*, Lin.

Questa specie serve di ospite intermedio al *Proteosoma*, parassita degli uccelli, e secondo le ricerche del Bancroft e del Low in essa compie l'evoluzione la *Filaria Bancrofti*, la quale però può essere anche trasmessa da altre specie di *Culex* (*C. fatigans* Wied; *C. gelidus* Theob.; *C. sitiens* Wied; *C. albolineatus* Giles).

Nel genere *Stegomyia* Theobald, che ha una larghissima distribuzione geografica, si comprende la *St. fasciata* (Fabr.) (fig. 398).

Essa vive nella maggior parte delle coste comprese fra il 40° latitudine sud ed il 42° latitudine nord, dove cioè la media della temperatura oscilla fra i 25° e 35°. Ha abitudini notturne: predilige i luoghi umidi e si rinviene abbondante in riva al mare o lungo i grandi fiumi. Non si riscontra oltre i 300 metri d'altezza, e una temperatura inferiore a 23° o superiore ai 40° la rende incapace di pungere.

Questa Zanzara, assai comune anche fra noi, si distingue dalle altre per il colorito bruno-scuro, quasi nero, con macchie e disegni bianchi. Nel torace le macchie bianche hanno l'aspetto di una lira a due corde, con la base rivolta verso la testa, nell'addome e nelle zampe invece sono disposte a fascie.

La *St. fasciata* trasmette all'uomo la febbre gialla.

Il genere *Anopheles* comprende una grande quantità di specie, capaci di trasmettere la malaria.

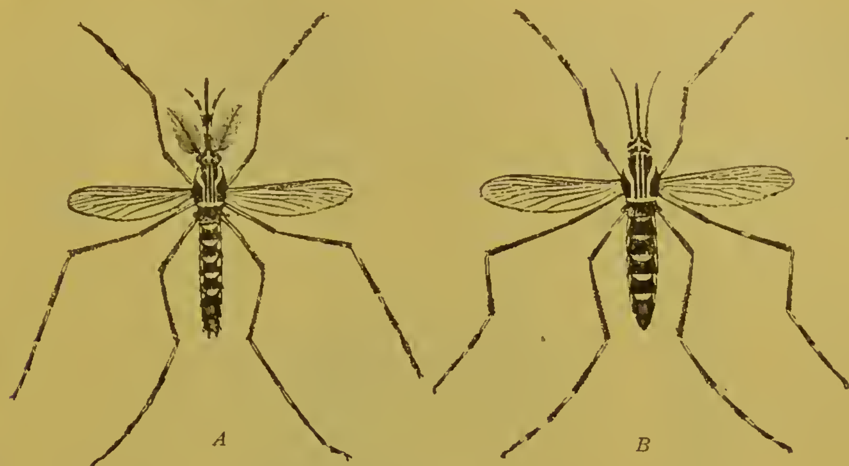


Fig. 398. — *Stegomyia fasciata*. *A*, maschio; *B*, femmina.

Sarebbe troppo lungo farne anche una semplice enumerazione, sicchè mi limiterò a dare i caratteri differenziali delle specie nostrane, che sono state riconosciute capaci di trasmettere le febbri malariche. Esse sono:

1° *Anopheles maculipennis* (Meigen, 1818).
2° » *bifurcatus* (Linneo, 1858).
3° » *superpictus* o *Myzomyia superpicta* (Grassi, 1899).
4° » *pseudopictus* o *Myzorhynchus pseudopictus* (Grassi, 1899).

La diagnosi di esse si fonda principalmente sulla varia macchiettatura delle ali, come dalla chiave seguente:

Ali	senza macchie.	*Anopheles bifurcatus*
	con quattro macchie nel mezzo dell'ala: due agli angoli di biforcazione delle forchette; una che occupa le nervature trasversa soprannumeraria, media e posteriore; una all'origine della seconda longitudinale.	*Anopheles maculipennis*
	con cinque macchie nere sulla nervatura costale, alternate con quattro macchie bianche	*Myzomyia superpicta*
	con il bordo costale nero interrotto completamente da due macchie fulvo-chiare (una all'estremità dell'ala e l'altra al termine del 2° terzo) ed incompletamente da una terza macchia chiara che non giunge all'ausiliare ed alla costale . . .	*Myzorhynchus pseudopictus*

Per una diagnosi più precisa, specialmente quando per la caduta delle scaglie la macchiettatura dell'ala non è appariscente, è necessario ricorrere ad altri caratteri distintivi che possono riassumersi nella seguente tabella:

TABELLA 99.

	A. maculipennis	*A. bifurcatus*	*M. superpicta*	*M. pseudopictus*
1ª cellula sottomarginale. . . .	grande.	grande.	grande	grande.
Antenne.	senza ciuffi laterali di scaglie.	senza ciuffi laterali di scaglie.	senza ciuffi laterali di scaglie.	senza ciuffi laterali di scaglie.
Torace	scaglie ricurve piliformi.	scaglie ricurve piliformi.	scaglie ricurve falciformi.	scaglie piliformi.
Addome.	scaglie ricurve piliformi.	scaglie ricurve piliformi.	scaglie ricurve piliformi, con aspetto peloso.	piliformi.
Testa	assenza di scaglie piatte, scaglie forcute dritte.	non scaglie piatte; scaglie forcute dritte.	scaglie diritte forcute.	scaglie diritte forcute.
Ali	grandi, scaglie lanceolate, con 4 macchie nel mezzo dell'ala; una grande in corrispondenza delle nervature trasverse sovrannumeraria mediana e posteriore; una all'origine della seconda longitudinale; le altre due in corrispondenza dell'angolo delle forchette.	grandi scaglie lanceolate senza macchie.	cinque macchie allungate nere sulla nervatura costale.	scure nell'insieme; margine costale nero con tre macchie fulvo-chiare; la prima lineare sulla 1ª longitudinale senza giungere nè all'ausiliaria nè alla costale; la 2ª è più grande e giunge fino al bordo; la 3ª giunge fino al bordo, ed è situata all'estremità dell'ala, ove è limitata da una piccola macchia oscura.
Palpi	senza anellatura.	senza anellatura.	tre anelli bianchi di cui uno terminale.	quattro anelli piccoli bianchi di cui uno apicale.
Zampe	senza anellatura.	senza anellatura.	con anellatura chiara terminale ai tarsi.	con anellatura chiara ai tarsi.
Lunghezza, compresa la tromba	mm. 7.5-10.	7-10 mm.	7-8 mm.	9-10 mm.

b) Per disseminazione.

In questa categoria si possono raggruppare tutte quelle Mosche, le quali, incapaci di pungere perchè hanno una tromba molle, vivendo in vicinanza delle abitazioni e avendo continui contatti con l'uomo stesso, possono divenire agenti disseminatori di malattie infettive o parassitarie.

Quando si pensi che questi insetti si posano continuamente sulle sostanze animali o vegetali in putrefazione, sugli escrementi, sugli sputi, sul pus, ecc.;



Fig. 399. — *Musca domestica*. *A*, adulta; *B*, larva.

quando si rifletta che i germi che si trovano in quelle sostanze, le quali servono anche di cibo alle Mosche stesse, oltre ad imbrattarne le complicate zampe, passano inalterati attraverso il loro tubo digerente e, insieme alle



Fig. 400. — *Calliphora vomitoria*.

loro feci, possono essere deposte qua e là sulla pelle, sulle mucose, sulle ferite dell'uomo, oppure sugli alimenti e nei liquidi stessi di cui ci nutriamo, si comprende assai facilmente quali gravi danni vengano indirettamente ad arrecarci.

Le numerose osservazioni ed esperienze ci hanno infatti dimostrato che le Mosche (*Musca domestica* Lin. (fig. 399), *Curtoneura stabulans* (Meig), *Calliphora vomitoria* Lin. (fig. 400), *Sarcophaga carnaria* Lin. (fig. 401), *Lucilia*

coesar (Lin), *Chrysomyia macellaria* (Fabr.) (fig. 402), ecc.) possono trasportare da luogo, a luogo, sia con le zampe, sia con gli escrementi tanto le uova e le larve di alcuni parassiti animali (*Taenia, Ascaris, Oxyurus, Trichocephalus, Ankylostomum, Necator,* ecc.) quanto i germi più svariati (*B. typhi, B. anthracis, V. cholerae, B. coli, B. pestis, B. tuberculosis, B. prodigiosum, B. pyocianeum, M. pyogenes aureus,* ecc.). ed anche parecchie spore di funghi (*Aspergillus. Penicillium,* ecc.).



Fig. 401. — *Sarcophaga carnaria.*

L'importanza quindi che esse assumono nella trasmissione di queste malattie è assai grande e còmpito dell'igienista è quello d'impegnare una lotta a tutta oltranza contro di esse.

Purtroppo però fino ad ora non possediamo mezzi sicuri e pratici per intraprendere questa lotta, la quale non può impegnarsi senza una esatta e completa conoscenza della biologia delle Mosche. Molto si è fatto, ma molto resta ancora a fare, tanto più che solo

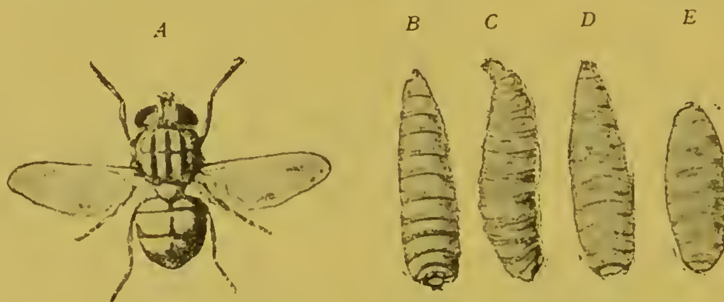


Fig. 402. — *Chrysomyia macellaria, A*, femmina adulta (dal Manson); *B, C, D*, larve dal dorso, di profilo e dal lato ventrale; *E*. pupa.

da poco comincia a rendersi popolare l'idea che questi insetti, più che molesti, sono oltremodo dannosi.

In ogni modo le vie da seguirsi nella lotta contro di esse possono ridursi alle seguenti:

1° Protezione delle abitazioni e degli alimenti contro l'invasione delle Mosche adulte.

2° Distruzione di queste per evitare che possano deporre le uova.

3° Distruzione delle uova e delle larve.

Protezione delle abitazioni e degli alimenti contro l'invasione delle mosche. — Il mezzo più semplice è quello della applicazione di reti metalliche alle porte ed alle finestre, come si usa per le zanzare: però tenendo conto che gli ambienti più frequentati dalle Mosche sono le cucine e le dispense, qui soprattutto dovrebbero applicarsi reti metalliche fine, nelle altre stanze può essere sufficiente anche l'applicazione di reti di refe anche a maglie relativamente larghe (un centimetro od un centimetro e mezzo). È

ottima abitudine tenere poi le camere in una semioscurità specialmente nelle prime ore del mattino ed in quelle pomeridiane, quando cioè le Mosche, per l'abbassamento della temperatura esterna, entrano nelle abitazioni.

Una certa influenza per tener lontane le Mosche sembra l'abbiano i vari colori coi quali son tinte le camere.

Le osservazioni di Fé e Galli-Valerio portano a concludere che esse difficilmente si posano sul bleu, sul viola pallido, sul bruno oscuro e sul giallo arancio.

Anche le emanazioni di alcuni odori servono sufficientemente bene ad allontanare le Mosche; così, ad esempio, io stesso ho potuto constatare che il cloroformio, l'etere, la trementina, la naftalina, il petrolio, il timolo le tengono lontane; di guisa che son riuscito a liberare completamente il mio studio o tenendo a permanenza sulla finestra una capsula con dell'ovatta inzuppata in petrolio, in cui faccio sciogliere qualche cristallo di acido timico; od anche cospargendo di quando in quando piccole quantità di tale soluzione sul pavimento. In tal guisa il puzzo del petrolio è corretto dal grato odore del timolo e l'azione delle due sostanze si somma.

Per quanto riguarda la protezione delle sostanze alimentari a nulla servano i veli mobili messi a loro diretto contatto. Le Mosche possono ugualmente nutrirsi ed insudiciarle con gli escrementi o con le zampe; qualche parte resta sempre indifesa; spesso, sovrattutto nel rimetterli a posto, invece di tener lontani gli insetti servono ad imprigionarli, mantenerli fissi e farli anche morire sulle stesse sostanze alimentari, ed inoltre non avendo certo la precauzione di collocare questi veli sempre dallo stesso lato, con grande facilità quello insudiciato il giorno innanzi dalle Mosche, viene il dì seguente a diretto contatto dei cibi.

Sicchè questi debbono proteggersi e collocarsi entro gabbie o credenze apposite costruite in modo che le sole parti laterali siano munite di reti metalliche.

Al disopra dovrebbero essere completamente coperte; giacchè le Mosche sia per le continue pulizie che fanno del loro corpo, sia per il camminare, il volare, il rincorrersi, fanno cadere sui cibi sottostanti particelle che imbrattavano le loro zampe e detriti ricchi di germi, i quali potrebbero trovare assai spesso negli alimenti sottostanti terreni adatti al loro sviluppo.

Distruzione delle mosche adulte. — Servono discretamente all'uopo le carte moschicide e tutte le sorte di trappole che vanno col nome di pigliamosche e questi mezzi avrebbero certo maggior diffusione se tanto raduno di Mosche morte, semivive o vive non facesse troppo schifo.

Meno adatte mi sembrano quelle sostanze (polveri insetticide, infusione di legno quassio, zucchero arsenicato, ecc.), che pur uccidendole fanno precedere la morte da un periodo più o meno lungo di stordimento. Durante questo periodo la Mosca vola senza direzione, sbatte qua e là ed il più delle volte va e cadere proprio dove meno si vorrebbe.

Si usa con discreto successo la soluzione di formalina al 10 % purchè sia rinnovata almeno ogni due giorni. Il modo più pratico per adoperarla è quello di metterla entro ad un recipiente assai largo (scodella. bacino, ecc.), sopra al quale o si tendono dei fili o meglio si colloca una rete metallica a larghe maglie, nelle quali si sia fatto aderire dello zucchero in polvere o si

sia posto qualche acino d'uva o qualche sostanza di cui siano ghiotte le Mosche. In campagna si usano con discreto risultato i mazzi di foglie di felce appesi nel mezzo del soffitto, specialmente delle cucine o delle dispense. A sera le Mosche si vanno a nascondere in mezzo alle foglie: si coglie questo momento per avvolgere cautamente il mazzo sospeso con una sacchetta e per uccidere gl'insetti. Questo mezzo, però, è perfettamente inutile se contemporaneamente non si proteggono le finestre degli stessi ambienti con reti metalliche; il giorno seguente si tornerebbe nuovamente da capo.

Ho veduto anche usare, là dove il numero è stragrande, la polvere pirica mista ad un po' di zucchero. Con uno staccio si distribuisce la miscela in una vasta superficie e si attende che le mosche si siano radunate per dar fuoco alla polvere. È questo un mezzo di indiscutibile successo, ma assai pericoloso.

Distruzione delle uova e delle larve — È anche questo uno dei problemi più ardui. Conoscendo le abitudini in genere delle Mosche che vanno a deporre le uova sulle carni e sostanze in putrefazione e sopra gli accumuli di stabbio, prima di ogni altra cosa dobbiamo evitare che ciò avvenga.

Le scuderie quindi debbono essere protette anche da reti metalliche; lo stabbio dovrebbe essere trasportato in carri ben coperti al deposito, il quale, se è tenuto in luogo chiuso, dovrebbe avere le finestre e le porte anch'esse protette da reticelle, se in luogo aperto è necessario che sia costituito da una fossa, nella quale lo stabbio dovrebbe rimanere *sempre* ed *interamente* ricoperto da uno strato di terra spesso 5-6 centimetri (Nash) oppure da polvere di cloruro di calcio. Basta che una piccola quantità di stabbio resti scoperta perchè la Mosca vada a deporvi le uova o le larve.

Si sono usate anche altre sostanze (saprolo, olio di schisto, ecc.), ma con resultati scarsi o nulli.

Qualunque mezzo si adoperi non si potrà mai raggiungere completamente lo scopo se non si renderanno prima popolari le conoscenze sui gravissimi danni che tutte le Mosche possono arrecare.

PARTE III.

TECNICA PARASSITOLOGICA.

Ne' capitoli precedenti noi abbiamo descritto i vari parassiti, il loro modo di comportarsi nell'organismo umano e nell'ambiente ove essi vivono: ora dobbiamo invece dire come si ricercano, si raccolgono, si conservano, sia per farne raccolte, sia per studiarne l'intima struttura.

Sarebbe troppo lungo prenderli in esame uno ad uno: per brevità li dividerò in categorie, secondo cioè l'ambiente loro di vita, che ben risulta dallo specchio seguente:

Parassiti che vivono	liberi nell'ambiente esterno o alla superficie cutanea dell'ospite				*Acari* - *Rincoti* - *Afanitteri* - *Brachiceri* - *Nemoceri*, ecc.
	nell'ospite, in mezzo a sostanza	liquida	comunicante con l'esterno per vie naturali	Secrezioni nasali	*Linguatule* - *Larve di mosche* - *Miriapodi*
				Catarro bronchiale	*Larve di Strongili* - *Distomi pulmonari* - *Echinococco*
				Vomito	*Cestodi* - *Larve di mosche* - *Gordius*, ecc.
				Sperma	*Histiogaster spermaticus*
				Muco vaginale	*Uova di Oxyurus e di Ascaris* - *Tyroglyphus* - *Sarcoptes* - *Echinococcus*
				Urina	*Uova di Bilharzia* - *Echinococchi* - *Embrioni di Filaria Bancrofti* - *Uova di Eustrongylus*
			raccolto in cavità chiuse	Sangue	*Bilharzia* - *Embrioni di Filarie*
				Pus	*Distomi* - *Echinococchi* - *Filaria medinensis* e accidentalmente *Ascaridi* - *Ossiuridi* - *Tricocefali*
				Liquido peritoneale	*Embrioni di Filaria* - *Echinococco*
				Liquido articolare	*Echinococco*
				Liquido cefalorachidico	*Echinococco*
				Liquido cistico	*Echinococco*
				Umore vitreo ed acqueo	*Cisticerchi* - *Filarie*
		più o meno compatta	comunicante con l'esterno per vie naturali	Feccie	*Elminti ed uova* - *Larve di Mosca*, ecc.
				Cerume	*Acari* - *Demodex*
				Sevo	*Demodex*
			senza comunicazioni esterne	Tessuti varî	*Trichine* - *Cisticerchi* - *Larve di Mosche*
				Pelle	*Acari psorici* - *Filarie cutanee*
				Gangli	*Filarie* - *Linguatule*

PARASSITI LIBERI NELL'AMBIENTE O CHE VIVONO NELLA SUPERFICIE CUTANEA DELL'OSPITE.

1° Cattura, preparazione e conservazione per raccolte zoologiche.

I parassiti che vivono liberi e che possono giungere alla superficie dei nostro corpo, nelle pieghe dei nostri vestiti, nelle fessure del muro o dei mobili sono facili a ricercarsi e catturarsi. Basta conoscerne le abitudini. Per la cattura di quelli che non fossero visibili ad occhio nudo occorre armarsi di una lente. Ottime a questo scopo sono le lenti triple con montatura in corno, le quali, oltre ad avere il vantaggio di essere tascabili, possono dare varî ingrandimenti.

Una volta veduto il parassita è necessario catturarlo. I metodi variano secondo la natura, la sede e le abitudini di esso. Li dividerò quindi per categorie, dicendo il puro necessario per ciascuna di esse.

a) *Acari*. — Vivono alla superficie del corpo varî generi di Acari, alcuni grandi, che per nutrirsi han bisogno di aderire fortemente alla pelle (*Ixodidi*, *Argasidi*), altri invece piccoli, in cui l'adesione è lieve e si distaccano con grande facilità (*Trombidium*, *Dermanyssus*, *Tyroglyphus*).

Gli *Ixodidi* (compresi gli Argasidi) infossando il loro rostro armato di denticolature rivolte indietro aderiscono così fortemente che a volerli staccare dalla cute si corre il rischio di romperli ed il rostro può rimanere infisso nello spessore della pelle con perdita dell'integrità del parassita e danno, alle volte non lieve, dell'ospite. D'altra parte non si può permettere che si distacchino spontaneamente, giacchè questo avverrebbe solo quando siano completamente sazi, per il che occorrono anche più giorni. Si distaccano allora facilmente facendo cadere sul loro corpo delle goccie di benzina, di etere, di cloroformio e anche semplicemente del petrolio. Meglio però è l'uso dei vapori cloroformici, usati così: Si prende una comune provetta da saggio, o in mancanza qualsiasi altro recipiente di vetro. Sul fondo si colloca un batuffolo di ovatta bagnato con cloroformio. Con l'apertura del vaso si copre il parassita e si fà aderire bene alla pelle. Dopo poco esso sarà staccato in uno stato anche di narcosi. Presolo allora con una pinza, una spatolina, un pennello, secondo la grandezza di esso, si trasporta in un tubo ove sia stato posto preventivamente dell'alcool a 90°, avendo cura, se l'esemplare è sufficientemente grande, di fare una lieve incisione da un lato del corpo per permettere al fissatore di penetrare all'interno, ciò che non sarebbe altrimenti possibile, dato lo spessore e la natura chitinosa della cuticola.

I piccoli Acari invece, che aderiscono lievemente alla pelle e che spesso camminano su di essa, si catturano in un modo più semplice: Armato l'occhio della lente si segue il cammino di essi; quindi si prende un piccolo pennello inumidito in acqua od alcool (meglio questo) e si avvicina al parassita stesso, cercando possibilmente che la punta di esso tocchi la superficie ventrale. Quantunque le loro zampe siano munite di ventose e anche di artigli, esse aderiscono facilmente al pennello. Questo, immerso poi in un recipiente che contenga alcool a 70°, si agita bruscamente e celermente. Il parassita spesse volte ancor vivo cala in fondo al vaso. Ripetendo più volte la manovra si riesce a catturare molti esemplari.

Gli Acari invece, che trovansi in grande quantità nelle derrate alimentari (farina, formaggio, zucchero, vainiglia, ecc.) oltre che con l'aiuto del pennello come già si disse si catturano più numerosi nel modo seguente: La sostanza donde voglionsi isolare i parassiti si colloca in un recipiente più ristretto possibile, il quale a sua volta vien posto nel mezzo di un altro più grande, nel cui fondo vi sia un centimetro circa di acqua, o meglio di alcool a 90°. Si ricopre il tutto con una campana. Dopo qualche tempo gli Acari si troveranno abbondantissimi sul fondo del vaso maggiore. Si raccolgono in un vaso più ristretto, si decantano o centrifugano, si cambia l'alcool e si conservano.

b) *Rincoti*. — Possono vivere sempre sulla superficie del corpo (*Pediculus capitis*, *Phthirius pubis*) oppure rimanervi quel tempo necessario loro per nutrirsi, mentre il resto lo passano fuori dell'organismo (*Pediculus vestimenti*, *Acanthia lectularia*). I primi vivono sempre attaccati ai peli o alle parti del corpo provviste di peli e da esse predilette. È là che debbono ricercarsi non solo gli adulti, ma anche i giovani e le uova. Un comune pettine è buono per raccogliere qualche esemplare. Se però se ne vogliono prendere assai, occorre dapprima un'abbondante saponata, poi si passa con un pettine molto fitto, che ad ogni passata sarà lavato in un catino o meglio in un cristallizzatore che contenga una buona quantità di acqua. Per un po' di tempo gli insetti galleggeranno; allora si raccolgono su una spatolina con l'aiuto di un ago o si prendono col pennello e si passano in alcool. Quelli che fossero colati a fondo si raccolgono in ultimo, dopo aver decantato il liquido o averlo centrifugato. Le uova che sono attaccate ai capelli si asportano insieme con questi e si passano direttamente in alcool.

I Rincoti che vivono lontano dal corpo umano si ricercano o nelle pieghe degli indumenti che stanno a contatto della carne (*Pediculus vestimenti*) oppure nelle fessure delle tavole dei letti, dei mobili, nelle pieghe dei materassi, nelle connessure dei letti di ferro, ecc. (*Acanthia*). Per catturarli basta usare il pennellino bagnato con alcool, ciò è assolutamente indispensabile per le Cimici, che sono di una fragilità estrema.

Le uova, che aderiscono nel luogo ove vennero deposte, hanno bisogno di cautele speciali per essere distaccate. Un ago lanceolato, un bisturi da microscopio, o anche un semplice ago da dissezione, sono più che sufficienti. Tanto gli adulti, come i giovani e le uova, si conservano in alcool.

c) *Afanitteri*. — Le Pulci generalmente si prendono con le mani o meglio, per non sciuparle, si dovrebbero prendere come gli Ixodidi con tubo cioè sul cui fondo vi sia del cotone imbevuto di cloroformio. Spesso però può occorrere di aver necessità di catturare un gran numero di esse, specie sugli animali. Se questi son vivi si può procedere come per i pidocchi del capo. Se son morti da poco, si procede in due modi; o s'immerge l'animale in un recipiente pieno di acqua, o in un ambiente ove si fa evaporare del cloroformio. Nel primo caso le pulci, abbandonando subito l'ospite, verranno a galla e si catturano con pinze da microscopio o meglio con un pennello immergendole poi subito in alcool: nel secondo caso si raccolgono prima quelle che abbandonarono l'ospite e che si rinvengono anestetizzate nel fondo del recipiente, poi con un pettine si tolgono le altre che rimasero nei peli, e si passano anche esse in alcool. Le uova e le larve si trovano nelle fessure dei pavimenti ed ovunque vi sia un accumulo di polvere.

d) *Brachyceri.* — Quando le Mosche si trovano ferme su di una superficie piana si possono prendere con una provetta, purchè la bocca sia molto larga. Infatti avendo esse una sensibilità straordinaria difficilmente si giungerebbe in tempo a cuoprirle.

Se su una superficie molto curva si adopera un retino speciale a margini flessibili: durante il volo si catturano con un retino comune da farfalle. Le Mosche catturate possono uccidersi e conservarsi in alcool assoluto specialmente se debbono servire per preparazioni di sezioni: ma siccome da ciò può derivarne una alterazione di colore, gli esemplari che debbono servire per collezione debbono conservarsi a secco. In questo caso non appena uccise con i vapori di etere, clorotormio, di cianuro di potassio, o anche di benzina fenicata, occorre montarle. Ciò si può ottenere in più modi. Molti usano incollare la parte ventrale del torace ad un cartoncino lucido o un pezzo di talco di grandezza proporzionata all'inse to, e poi il cartoncino viene raccomandato ad uno spillo. Se questo metodo può adoperarsi per gli insetti molto piccoli che non possono essere infilati in spilli anche molto sottili, non è consigliabile per i grandi, giacchè questo genere di appiccicatura impedisce di poter osservare la faccia inferiore del Dittero. È consigliabile quindi la montatura diretta.

Per far ciò si adoperano spilli entomologici speciali di grandezza differente ma tutti della stessa lunghezza. Questi debbono essere di acciaio molto ben affinati ad una estremità, avere la testa molto piccola perchè non nasconda nessuna parte dell'insetto ed essere proporzionati alla grossezza del Dittero. Il quale, se la dimensione lo permette, sarà attraversato nel mezzo del torace, perpendicolarmente alla sua superficie, osservando bene che la punta dello spillo, uscendo dalla parte inferiore, passi in mezzo all'attaccatura delle zampe. Dopo averli infilati occorre distenderli convenientemente perchè assuma una posizione il più possibile naturale e in ogni modo tale da far vedere bene quanto più è visibile. Lasciare le zampe ripiegate su loro stesse sarebbe un grave errore. Per distenderli convenientemente si usano o degli stenditori appositi o del midollo di sambuco oppure anche più praticamente dei grossi turaccioli di sughero (fig. 403).



Fig. 403. — Metodo pratico per distendere bene gli insetti.

Nel mezzo di essi si pratica con una lima o con un coltello una scanalatura proporzionata alla grandezza del corpo dell'insetto. Questo si infigge nel mezzo di quella poi sollevate ad una ad una le zampe o le ali con un ago da dissezione e dispostele nel modo che si desidera, si procura che restino nella posizione voluta o con spilli o meglio con delle striscioline di carta lucida e resistente che alla loro volta vengono anche esse fissate alle due estremità con spilli piccoli. Terminata questa operazione si lasciano seccare.

Alle volte però accade, quando il numero degli insetti da preparare è grande, che non si giunga in tempo a prepararli tutti ed essi si dissecchino nella stessa posizione in cui morirono, la quale è quasi sempre in uno stato di rattrappimento. In questo caso, per evitare che avvengano rotture nel dar loro una disposizione conveniente, occorre rammollirli entro una camera umida. Questa può esser fatta in un modo semplicissimo. Si pone un po'

d'acqua in un piatto; su di essa si fa galleggiare un pezzo di sughero sul quale si colloca l'insetto e si cuopre con un bicchiere capovolto.

Invece dell'acqua si può usare della sabbia o anche della segatura bagnata.

Una volta inumiditi, le varie parti del corpo torneranno flessibili e si procederà alla montatura usando gli stessi metodi e le medesime precauzioni come quando erano freschi.

Quando questi Ditteri saranno convenientemente preparati e montati su spilli si conserveranno entro scatole che abbiano una chiusura ermetica per ripararli dalla polvere e dai tarli che in breve distruggerebbero la collezione. Gli esemplari da prepararsi per ciascuna specie deve essere in numero tale che ci dia per ogni sesso possibilmente varie posizioni (dorsale, ventrale e laterali). Nelle scatole da spedirsi per posta bisogna curare che gli insetti non restino troppo ravvicinati fra loro, che gli spilli sieno fortemente infissi nel sughero o nella torba costituenti il fondo, che le loro capocchie si trovino tutte alla stessa altezza e che il coperchio della scatola, pur non facendo pressione su queste, si trovi così vicino alla spilla da impedirne l'uscita dal posto evitando urti e guasti irreparabili. Ogni scatola poi deve essere bene imballata dentro una più grande in mezzo a molta ovatta per evitare più che possibile l'azione degli urti. Per quante precauzioni però si prendano l'imballaggio di esemplari conservati per via secca, già montati, non garentisce in modo assoluto l'integrità di essi. Per conto mio preferisco che gli esemplari destinati a collezioni, da spedirsi in luoghi lontani, vengano conservati per via umida e a tutti i liquidi conservatori preferisco l'alcool a 90°. Questo modo di conservazione e spedizione, oltre al vantaggio di poter mandare in poco volume molti esemplari, non impedisce che giunti a destinazione possano esser poi montati a secco. L'azione decolorante dell'alcool nella massima parte dei casi si riduce a ben poca cosa in confronto ai rischi gravi cui possono andare incontro durante il viaggio, malgrado l'ottima condizionatura, gli esemplari preparati a secco.

Anche per le spedizioni di organismi conservati in alcool debbono però prendersi delle precauzioni speciali:

1° i tubi sieno proporzionati all'insetto che debbono contenere; abbiano le pareti abbastanza robuste e possibilmente il fondo piano;

2° ogni tubo contenga, se è possibile, un solo esemplare. Quando ciò non possa farsi, gli insetti vengano divisi l'uno dall'altro da batuffoli d'ovatta in modo però che non vengano compressi e che ciascuno abbia nello spazio che gli vien dato tutte le indicazioni necessarie (luogo, data di cattura, ecc.);

3° le indicazioni necessarie debbono essere scritte in lapis o meglio in inchiostro di Cina. Io soglio scriverle su di una listarella di cartoncino resistente, alla quale dò dimensioni determinate, e precisamente una lunghezza di circa i due terzi della circonferenza del tubo e un'altezza uguale allo spazio riservato all'insetto. La colloco nel tubo accartocciata poi in modo che la superficie scritta aderisca alla faccia interna di esso e si possa leggere dall'esterno; e ripiego ad angolo i quattro angoli della listarella stessa. In questo modo mentre da un lato si scorge bene l'insetto dall'altro si legge quanto è scritto sul cartoncino, che a sua volta non può muoversi e non può danneggiare l'insetto perchè è tenuto a posto dai batuffolli d'ovatta, che sono a contatto con esso, mentre questi si mantengono costantemente di-

stanti fra loro nè possono ravvicinarsi data la ripiegatura degli angoli del cartoncino;

4° si impedisca il contatto delle bolle d'aria con gli insetti immersi nell'alcool; esse potrebbero danneggiarli. Per ottenere ciò, dopo aver riempito il tubo di liquido vi si spinge dentro un batuffolo d'ovatta e con una sonda scanalata si allontana completamente la bolla che resta al disotto di questo. È necessario però che una piccola quantità di aria rimanga al disopra perchè altrimenti, aumentando la temperatura, il turacciolo potrebbe essere spinto via.

5° il turacciolo sia di sughero compatto e buono, e possibilmente venga all'esterno spalmato di cera o di paraffina (mai con ceralacca che è sciolta dall'alcool).

Tutti i tubi così preparati avvolti in abbondante ovatta debbono essere collocati entro scatole robuste.

Non bisogna mai fare affidamento sulla scritta *fragile, oggetti di storia naturale*, che per precauzione si sogliono scrivere sui pacchi. Garentiamoci con ogni scrupolo contro i possibili guasti, giacchè se non lo facciamo noi non lo faranno certo gli impiegati postali che hanno migliaia di pacchi da controllare e spedire nel minor tempo possibile.

e) *Nemoceri* (Zanzare in senso lato). — Gli *adulti* si catturano con un tubo di vetro di diametro piuttosto grande (2 cm.). Spesso la zanzara anche dopo la sovrapposizione del tubo resta immobile sulla parete, basta allora spostarlo alquanto fino a toccarla. Essa infastidita volerà subito raggiungendo il fondo: si deve approfittare di questo momento per chiudere l'apertura con un batuffolo di ovatta.

Se si voglion raccogliere molti esemplari è necessario provvedersi o di molti tubi corti entro a ciascuno de' quali si colloca un solo esemplare, o di più tubi lunghi ove si racchiudono due o tre esemplari divisi l'uno dall'altro da batuffoli di ovatta come si disse per i Brachiceri. Con questi sistemi però si avrà un bagaglio troppo ingombrante non solo, ma le Zanzare difficilmente sopravvivranno, malgrado che con vari sistemi ingegnosi si sia provveduto a mantenere e rinnovare l'aria entro gli spazi riservati a ciascuna di esse. Giunti in laboratorio se si vogliono preparare le Zanzare così raccolte si uccidono con i vapori di cloroformio, di etere, benzina, xilolo o col fumo di tabacco e si procede alla montatura. Però siccome esse sono assai piccole e fragili è bene adoperare degli spilli assai sottili (N. 20) e corti: questi si infilano su cartoncini rotondi (fig. 404) i quali vengono poi raccomandati ad uno spillo più grosso.

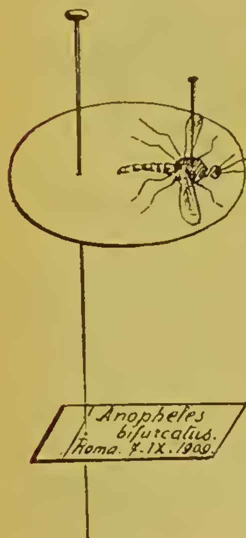


Fig. 404. — Montatura a secco di una Zanzara.

Se poi gl'insetti si volessero conservare vivi per un tempo più o meno lungo, meglio è, dopo averli catturati, riunire quelli di ciascuna località entro un vaso comune, piuttosto grande. Si preferiscono i vasi a bocca larga e fondo piano (io soglio adoperare quelli in cui si conservano le mostarde di frutta). L'apertura viene chiusa da un velo. Nel centro di esso si pratica un foro che abbia un diametro uguale a quello del tubo che serve per la cattura e si chiude con ovatta. Nell'interno si pongono dei fuscellini di scopiglio ad uno de' quali si infilano o dei pezzi di frutta

(uva, ecc.) oppure un piccolo batuffolo di ovatta bagnato in acqua zuccherata. Per mantenere poi l'ambiente umido si può collocare sul fondo un po' di sabbia bagnata oppure un vetrino da orologio che contenga un po' d'acqua, sulla quale si fanno galleggiare dei piccoli pezzi di sughero ove possano posarsi le zanzare quando vogliono deporre le uova. Le zanzare man mano che vengono catturate si fanno passare con ogni cautela dal tubo nel vaso maggiore, ove in gran numero possono mantenersi per più giorni, fino a che anche quelle che si rinvennero con lo stomaco pieno di sangue lo abbiano completamente digerito. Così possiamo mantenerle a nostra disposizione e prenderle al momento del bisogno ad una ad una con una provetta.

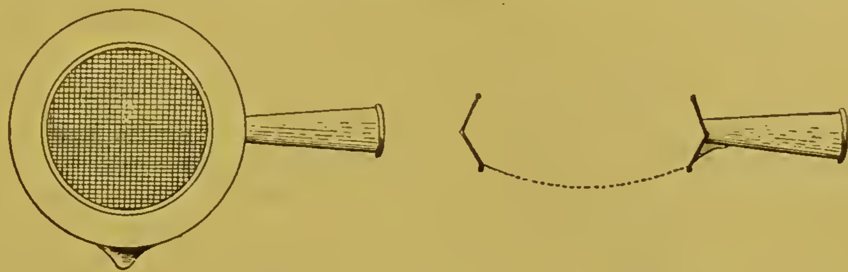


Fig. 405. — Colino per la cattura delle larve e ninfe di Zanzare.

Ciò non è facile ed occorre anzi una gran pazienza e molta pratica. Io soglio usare per questa operazione una provetta piegata ad angolo quasi retto in modo che la bocca possa adattarsi alle pareti interne del vaso, e venga facilmente a coprire la zanzara che su essa si posa. Si attende quindi



Fig. 406. — Pesca di larve e ninfe di Zanzare.

che essa voli al fondo del tubo per ritirarlo e chiuderlo con batuffolo di ovatta.

Una volta catturata si uccide con i vapori di cloroformio e si passa alla preparazione ed esame degli organi interni, i quali per il medico si riducono allo stomaco ed alle glandole salivari.

Le *larve* e le *ninfe* di Zanzare si catturano con retini a maglie fittissime. Ottimi sono i colini da brodo procurando che siano abbastanza grandi. Nell'Istituto adoperiamo dei colini speciali che diversificano dai comuni per avere nella parte svasata un bordo circolare rientrante largo almeno tre centimetri (fig. 405). Il colino vien fissato ad un lungo bastone. Quando si vogliano pescare le larve o le ninfe si immerge per metà un po' obliquamente nell'acqua; si fa scorrere alla sua superficie (fig. 406) e con un mezzo giro di rotazione si solleva tenendolo alquanto obliquo in modo che nello spazio compreso fra il bordo ed il fondo resti un po' d'acqua. Le uova, le larve, le ninfe e molti altri insetti acquatici restano lì nuotando. Allora con una pipetta o con un pennellino si raccoglie quanto si desidera e si passano in un vaso a bocca larga che, a metà ripieno d'acqua, s'era in precedenza preparato.

Si cerchi di non mescolare le larve o le ninfe di zanzare con altri insetti acquatici, i quali potrebbero cibarsene. Si procuri di mettere dentro il vaso delle piante acquatiche ed anche qualche listarella di sughero perchè gli adulti, nascendo, possano posarvisi sopra. Il recipiente deve essere tenuto in luogo appartato e lontano dalla luce diretta, sia coperto da un velo o meglio, come usiamo noi in laboratorio, chiuso entro una piccola camera con le pareti di rete metallica, ove poi, man mano che occorrono, si prelevano gli esemplari adulti nati in schiavitù dalle ninfe.

2° Preparazione per ricerche anatomiche.

Se gli Artropodi catturati dovranno servire per ricerche anatomiche occorre procedere diversamente, giacchè è necessario subiscano le manipolazioni seguenti:

1° anestesia;
2° fissazione;
3° conservazione propriamente detta.

L'*anestesia* serve per uccidere l'animale in modo lento e tale che esso non subisca contrazioni prima di morire, mantenga, in una parola, la forma che aveva in vita. Ottimi allo scopo sono il cloroformio e l'etere che agiscono in brevissimo tempo: non avendo però disponibili nè l'uno nè l'altro, può ricorrersi al fumo di tabacco il quale, oltre ad essere di poco costo ed alla portata di tutti, ha anche il vantaggio di far rilasciare i tessuti. Si adoperano anche, specialmente per gli animali acquatici, la cocaina ed il cloralio. Per l'una o l'altro debbono però usarsi soluzioni deboli che vanno aggiunte gradatamente all'acqua ove vivono gli esemplari da anestetizzare

La *fissazione* si può avere con vari liquidi. I migliori sono i seguenti:

1° *alcool assoluto*, preceduto dal passaggio negli alcool più deboli (a 60°, 80° e 95°);

2° *liquido di Perenyi*. (Soluzione acquosa d'acido cromico al mezzo per cento cmc. 30. Acido nitrico 10 % cmc. 40. Alcool a 90° cmc. 30). L'insetto può mettersi anche vivo entro questo fissatore. Dopo che vi sarà rimasto, da mezz'ora a un'ora e mezza, secondo la grandezza di esso, si passa successivamente per la serie degli alcool a 60°, 80° e in ciascuno si lascia per circa 6 ore quindi si colloca in alcool a 95° ove può rimanere per un tempo indefinito;

3° *sublimato corrosivo*. Sebbene si usi generalmente la soluzione acquosa satura, consiglierei per questi Artropodi la seguente formula:

Sublimato	gr.	8
Acqua distillata	cmc.	100
Cloruro sodico	gr.	0.50
Alcool a 90°	cmc.	50
Acido acetico glaciale	»	5

In tal guisa è molto più rapido nella penetrazione. Gli animali debbono essere lasciati poco tempo nel fissativo, un paio d'ore al più, poi, dopo averli lavati a lungo in acqua (4-6 ore), si passino in alcool a 70° al quale sia stata aggiunta della tintura di jodio jodurata fino ad avere un colorito marsala: l'alcool jodato va sostituito più volte con del nuovo fino a che non si decolora più: poscia l'animale si immerge in alcool a 90° che si cambia fino a che tutta la colorazione data dallo jodio non si trasmetta più all'alcool.

La *conservazione* di un insetto fissato in uno dei modi suddetti può ottenersi con l'alcool a 90°, con una soluzione di formolo in acqua (4 %), oppure con una soluzione di formolo alla quale si sia aggiunto l'uguale volume di alcool a 75°. Ora se il formolo quando è combinato con l'alcool dà buoni risultati, non consiglierei mai di usarlo in soluzione semplice acquosa. Oltre a gonfiare i tessuti scioglie col tempo tutti i sali calcarei che si possono trovare in essi determinandone la macerazione.

Per le ricerche istologiche bisogna poi seguire tutte le norme che suggerisce la tecnica microscopica.

PREPARAZIONE DELLE GLANDOLE SALIVARI DELLE ZANZARE. — Spesso una leggera e graduale trazione della testa, avendo cura di tener ben fermo il torace, basta a metterle in evidenza: ma qualche volta ciò non è sufficiente: occorre allora procedere con maggior cautela. Alla zanzara vengono dapprima tolte le zampe e le ali e, con un pennellino di vaio sottile viene privata dal maggior numero possibile di squame; poscia è collocata di fianco in mezzo ad una goccia di soluzione fisiologica sopra un copri-oggetti. Tenendo fermo l'animale con un ago ricurvo all'apice sulla parte gibbosa del torace, con un altro si pratica una piccola incisione nella parte dorsale del collo, là dove questo si unisce al torace (fig. 407) e precisamente ove nella figura esiste un punto nero, per rendere meno stabile la saldatura di queste due parti.

Poi i due aghi si collocano uno dietro la nuca lungo la linea *AB*, l'altro avanti al torace lungo la *CD* ed a leggerissimi scatti si allontana sempre più dal torace la testa, la quale non tarderà a staccarsi e a portar dietro con sè le glandole salivari che appaiono subito chiaramente natanti nel liquido e aderenti alla testa per il loro condottino escretore. Usando grande precauzione, sempre con gli aghi e con l'aiuto di una buona lente, si possono isolare completamente liberandole della fitta rete di trachee e dai muscoli del collo e della testa che le attorniano.

PREPARAZIONE DELLO STOMACO DELLE ZANZARE. — Si può utilizzare la stessa Zanzara cui vennero estratte le glandole salivari.

Anche per questa manipolazione, come per la prima, è bene adoperare

aghi ricurvi all'apice per poter poggiare le mani, tenerle in posizione più adatta ed evitare ogni possibile tremolio.

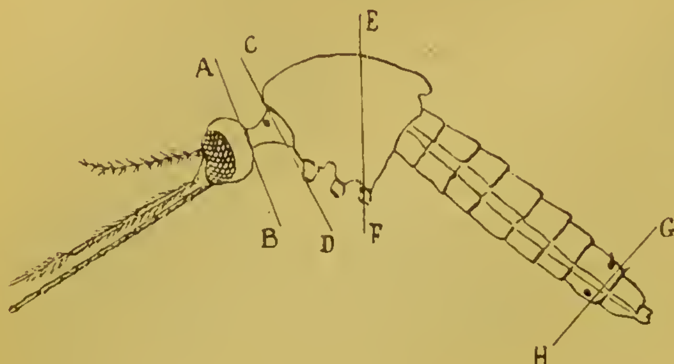


Fig. 407. — Schema per la preparazione delle glandole salivari e dello stomaco di Zanzara.

Sempre su un vetrino porta-oggetti in una goccia di soluzione fisiologica si praticano dapprima due incisure sui margini laterali del 7° ed 8° segmento addominale nel luogo segnato dai due punti neri; poscia, mentre con un ago si tien fermo il torace lungo la linea *EF* con l'altro, poggiato sugli ultimi due segmenti, si esercita una trazione lieve e graduale fino a che compaia anche il proventricolo.

Lo stomaco in tal modo sarà cavato facilmente e con esso l'intestino ileo, i tubi malpighiani, il retto e le ovaia.

Queste possono venire asportate per poter esaminare più agevolmente il tubo digerente. Allora con un pennellino di vaio si toglie l'eccesso di liquido, si asportano i detriti, le squame, le goccie di grasso che possono insudiciare il preparato, si rinnova l'acqua fisiologica e vi si pone sopra il copri-oggetti avendo cura che il proventricolo si trovi da quel lato dello stesso copri-oggetti che per primo si adagia sul porta-oggetti. Si stabilirà così una corrente di liquido che tenderà a distendere il preparato portando indietro i tubi malpighiani, i quali altrimenti andrebbero ad impedire la visione netta dell'intero stomaco.

Tutte queste operazioni di dissezione debbono esser fatte su un microscopio semplice o con l'aiuto di una lente montata sopra un piede articolato.

Gli organi così preparati, vengono generalmente esaminati a fresco ma possono fissarsi col formolo al 2 %, col sublimato alcoolico o con acido cromico (liquido di Perenyi): e, dopo averli trattati come un pezzo istologico, si montano in paraffina per farne sezioni col microtomo e passarli alle più fine colorazioni, quando si vogliano studiarne le particolarità di struttura.

B) PARASSITI CHE VIVONO NELL'OSPITE.

1° Parassiti viventi in una sostanza liquida o compatta comunicante con l'esterno.

Esame delle feci. — È quello che più di frequente occorre di fare tanto più che in esse possono rinvenirsi numerosi parassiti, e con maggior frequenza le loro uova. Comincerò quindi a dare qualche consiglio circa al modo di procedere per questo esame tanto più che io ritengo assolutamente necessario che un medico davanti ad un ammalato, esegua sistematicamente l'analisi delle feci sia macroscopica che microscopica, sia fisica che chimica, così come

fa quello delle urine. Perchè anche quando la diagnosi si presenti non dubbia, occorre che il medico sappia se alla malattia diagnosticata si complichi qualche parassita intestinale, il quale può aggravare la prognosi, quando anche non determini l'esito letale. Un Ascaride, infatti, che vive quasi innocuo in un organismo sano, veste tutte le forme di un nemico pericolosissimo, in un tifo addominale. Esso può aggomitolarsi nella parte dell'intestino già lesa, preme su di essa, la distende e ne affretta la perforazione con le sue fatali conseguenze.

Ed i casi riferiti da Leroux, da Friedberg, da Fröhner e dal Principe di Monaco sono lì ad attestare come gli Ascaridi possano anche attaccarsi alla mucosa intestinale producendo dei fenomeni catarrali e zone emorragiche con vere e proprie ulcerazioni.

E come gli Ascaridi molti altri parassiti dell'intestino, specialmente quelli che hanno apparati boccali armati e capaci quindi di ledere la continuità della mucosa intestinale, possono aprire la via alla penetrazione in circolo de' germi patogeni che per loro stessi avrebbero attraversato innocuamente l'intestino.

Da ciò la necessità di saper fare *bene* un esame delle feci perchè nessun parassita, anche piccolo, possa sfuggirci e perchè le uova, che vengono da esso continuamente emesse, possano mettersi in evidenza nel modo migliore e più sicuro, con i metodi di tecnica che nella pratica risultano i più adatti.

Prelevamento delle feci. — Le feci debbono essere raccolte in modo che non vi si mescoli l'urina. Non occorre fissare l'ora della raccolta nè far precedere pasti di prova. Se ciò gioverà assai negli esami chimici o in quelli tendenti a stabilire il bilancio nutritivo, sarebbe superfluo per un esame a scopo diagnostico per la ricerca dei parassiti o delle loro uova.

Le deiezioni debbono essere il più possibile raccolte appena emesse per poterne rilevare subito i caratteri fisici stabilendo la reazione, consistenza, odore, colore e vedere se contengono elementi speciali: muco, pus, sangue, ecc. Ciò si rende anche necessario per poter stabilire se si tratti di un parassita piuttosto che di un altro. Così ad esempio se si rinvengono *larve rabditiformi* nelle feci appena emesse si può con sicurezza dire che si tratti di larve di *Strongyloides intestinalis* mentre che se le feci fossero esaminate tardivamente vi si potrebbero rinvenire delle larve egualmente rabtidoidi appartenenti all'*Ankylostomum*, le quali facilmente potrebbero essere confuse con quelle. Sarebbe bene quindi che in alcuni casi speciali il prelevamento si facesse direttamente dall'intestino con un cucchiaio di vetro o con l'apparecchio di Conheim e che le feci così prelevate si sottoponessero subito all'esame.

I caratteri fisici e l'eventuale rinvenimento di muco e di sangue può preparare il nostro indirizzo diagnostico, che si fisserà poi indubbiamente sotto il microscopio. Il muco, per esempio, in grande quantità può stare in rapporto con la presenza di *Tenie*, ed il sangue può farci pensare ad abrasioni intestinali dovute ad alcuni parassiti come l'*Ankylostomum* e l'*Oxyurus*, oppure alle uova di *Bilarzia*, ecc.

Anche l'odore può mettere sulla buona strada, indicandoci con le sue caratteristiche la presenza nell'intestino di alcuni parassiti, che sono capaci di modificarlo. come gli Ascaridi e gli Anchilostomi.

I primi conferiscono alle feci un odore acre, caratteristico; i secondi per lo più quello di formaggio *gorgonzola*.

Gli altri criterî, colore, consistenza, reazione, presi insieme e bene rilevati, daranno un concetto generale dello stato patologico o meno dell'intestino, e può esserci utile nella prognosi.

Le feci appena emesse debbono raccogliersi in un cristallizzatore coperto da un solido vetro trasparente oppure in una grande capsula Petri.

Deodoramento delle feci. — Raccolte appena le feci ed espletato questo esame sommario, si passa al deodoramento, che ha grande importanza per ben condurre gli esami successivi. Poichè se possiamo agevolmente riuscire a vincere la ripugnanza per il maneggiamento del materiale fecale, non è certamente da tutti saperne sopportare il puzzo, specie quando, patologicamente modificato, raggiunge le più alte tonalità della nausea. Io aggiungo all'acqua di diluizione, quando occorre, un'eguale quantità di soluzione al millesimo di sublimato corrosivo, od anche di lysoform. Preferisco il sublimato, poichè il lysoform saponifica troppo la massa fecale. Del resto l'una e l'altra soluzione non esercitano influenza alcuna sui parassiti, ed anzi il sublimato presenta il vantaggio di agire come ottimo fissatore, preparando così il materiale ad esami ulteriori, ed alla stessa conservazione.

S'intende di leggieri come l'una e l'altra sostanza non possano venire adoperate, quando si vogliano i parassiti vivi, o si desidera far poi sviluppare le uova. In questo caso il meglio che si possa fare è di procedere a molti e successivi lavaggi con acqua di fonte, la quale, se non lo toglie del tutto, attenua certamente il cattivo odore.

Del resto l'aggiunta di acqua è sempre assai utile perchè nelle feci liquide ed in quelle rese tali la ricerca e la cattura dei parassiti è assai più agevole.

Per renderle omogeneamente liquide, dopo avervi aggiunto acqua, si usa una larga spatola preferibilmente pieghevole o anche meglio un pennello piatto (*pennellessa*) di robuste setole. Questo sistema è assai preferibile al mortaio giacchè si è sicuri di non danneggiare i piccoli parassiti.

Esame macroscopico delle feci. — Questo si propone il doppio scopo, d'isolare cioè e d'identificare i parassiti che eventualmente vi si trovino.

Se questi sono grandi il compito è assai facile; ma non è così agevole quando si ha che fare coi piccoli vermi come *Oxyurus*, *Ankylostomum*, *Taenia nana*, ecc.

Il loro colorito infatti è assai variabile giacchè possono assumere le più svariate sfumature dal bianco al giallo rossiccio, dal verdastro al bruno e confondersi assai facilmente con i residui alimentari e specialmente con le fibre vegetali.

Un dato di fatto però che può agevolare la nostra ricerca è quello che, qualunque sia la mole del parassita, *esso va sempre in fondo del recipiente.*

Ciò premesso io soglio procedere nel modo seguente.

Innanzi tutto mi provvedo di qualche bacinella di cristallo (quelle che si adoprano per la fotografia) di varia grandezza, che abbiano le pareti liscie, piane e a faccie parallele. Preferisco quelle di cristallo a quelle di maiolica perchè date le varie tonalità di tinta de' parassiti posso modificare il colore del fondo trasportandole successivamente su fogli di carta di vario colore (bianchi, grigi, neri, ecc.), anzi preferisco addirittura tingere la parte esterna del fondo della bacinella, in modo che, mentre da un lato sia completamente nera, vada per gradazioni di sfumature a continuarsi in bianco candido e termini perfettamente trasparente.

Preparata in tal modo la bacinella preparo degli aghi ricurvi, una spatolina, un pennello di vaio ed un paio di pinze da microscopio.

In seguito, dopo aver diluito le feci nel cristallizzatore, le verso in un grosso bicchiere a calice e le lascio poi depositare; decanto poi cautamente avendo l'avvertenza che il liquido che verso corra lungo una bacchetta di vetro e vada a cadere in un altro cristallizzatore, attraversando prima un setaccio a maglie sottili. Torno ad aggiungere acqua nel calice procurando che il getto sia forte. Con una bacchetta agito il liquido in modo vorticoso, lascio depositare e torno a decantare. Dopo aver ripetuto questa operazione tre o quattro volte e dopo un'ultima decantazione, verso tutto il deposito nella bacinella, mentre pongo nel bicchiere tutto il liquido di rifiuto che attraversò il setaccio e che raccolsi nel cristallizzatore.

Nell'esaminare il liquido raccolto nella bacinella e che conterrà senza dubbio il maggior numero di parassiti, bisogna aver l'avvertenza che la luce sia piuttosto viva e cada obliquamente alla superficie dell'acqua. Occorre inoltre imprimere a questa dei leggeri movimenti di ondulazione con la mano sinistra.

Allora si vedranno i parassiti, per quanto piccoli, rotolare pian piano sul fondo del recipiente, trasportarsi da un punto all'altro di esso, attraversare necessariamente tutte le sfumature di colorito del fondo, e, mentre essi avranno un lento movimento e per il loro peso e per l'attrito che incontrano sul fondo stesso, i detriti alimentari, assai più leggeri e galleggianti, avranno lo stesso movimento ondulatorio del liquido che li contiene.

Con la destra armata d'un ago ricurvo all'apice e con l'aiuto di una sottile spatola, tenuta con la sinistra, se ne raccoglie il maggior numero possibile. Adopero un ago piuttosto che un pennellino perchè con questo, oltre il parassita, si raccoglierebbe una buona quantità di detriti alimentari. Quando la raccolta è terminata si getta il liquido rimasto attraverso il setaccio, e si unisce a quello conservato nel bicchiere a calice.

Si esamina con lo stesso metodo tutto il materiale rimasto nel setaccio stesso, mentre si riserberà quello che fu raccolto nel bicchiere a calice per procedere all'esame microscopico.

I parassiti che si vengono man mano raccogliendo (Cestodi, Trematodi, Nematodi, larve di Mosche ed altri eventuali parassiti o pseudo-parassiti) si passano in soluzione fisiologica, dove, se le feci non furono trattate con sublimato corrosivo, vivono bene per qualche tempo. L'acqua distillata o comune li gonfierebbe e li deformerebbe. A questo punto gli esemplari sono pronti per passare alle successive manipolazioni.

Esame microscopico delle feci. — Le stesse feci che rimasero in fondo al calice dopo l'esame macroscopico, possono e debbono venire utilizzate per l'esame microscopico. Infatti tutte le manipolazioni suaccennate hanno per scopo di raccogliere in piccola massa tanto i parassiti più grossi, quanto quei piccoli e le loro uova contenuti nelle deiezioni. E questo è tanto più utile quanto il numero di essi è più scarso. Poichè quando le feci contenessero molte uova non occorre di decantare, di lavare, di filtrare e qualche volta di centrifugare; basta prelevarne una piccolissima quantità con una piccola pipetta quando siano liquide, o con un'ansa di platino quando siano solide, spanderla sopra un vetrino porta oggetti, aggiungervi quel tanto d'acqua, che occorre, coprire con un copri-oggetti ed osservare al microscopio, scorrendo il vetrino in tutte le parti del preparato.

Ma quando poi le uova o le larve fossero poche, e non si riuscisse con questo metodo rapido a scoprirne qualcuna o si desiderasse raccoglierne molte per seguirne lo sviluppo; ottimo mezzo è il seguente:

Si diluiscono le feci in una grande quantità di acqua, avendo cura che le materie fecali si sciolgano completamente: si decanta poi il liquido. Il residuo viene filtrato attraverso ad un velo molto fitto come quello che serve per passare il fior di farina del N. 000 od anche quello che si usa comunemente per i retini da *plankton*. Alla filtrazione si fa seguire un abbondante lavaggio del velo con acqua di fonte o meglio con acqua distillata a getto forzato.

Si decanta nuovamente tutto il liquido filtrato ed il residuo viene centrifugato.

Il deposito, costituito da una fitta poltiglia, è quasi esclusivamente composto di uova o di larve e solo in minima quantità vi si trovano detriti vegetali e fibre muscolari.

Se però non si vuol seguire lo sviluppo e si desidera un isolamento di uova più perfetto si possono seguire altri metodi.

a) *Metodo di Telemann*. — Si pone in una provetta una determinata quantità di feci che si rendono poltacee, ove non lo fossero, con aggiunta di acqua. Ad esse si uniscono etere solforico ed acido cloridrico in parti uguali e si agita il tutto fortemente. Questa miscela si passa attraverso un setaccio a maglie sottili, e il passato si centrifuga per un minuto per eliminare le parti grossolane. Nel liquido si scorgeranno allora tre strati, uno superiore di acidi grassi disciolti in etere, uno medio costituito di particelle sciolte nell'acido ed uno strato inferiore ricco di sostanze vegetali, di fibre muscolari e ricchissimo di uova che hanno resistito, in virtù del loro guscio chitinoso, all'azione dell'acido e dell'etere.

Questo metodo è molto utile specialmente quando il numero delle uova è scarso, ma ci presenta qualche inconveniente che può divenire di una certa entità quando non si ha molta pratica nel riconoscimento delle uova stesse. Infatti ho potuto constatare più volte che le uova più delicate subiscone delle alterazioni. Cosicchè noi vediamo che, mentre in quelle di Anchilostoma si disfanno i blastomeri così caratteristici ed il contenuto si mostra uniforme, in quelle di Ascaride viene distrutto il guscio esterno mammellonato non rimanendo che quello interno. Per evitare confusioni quindi io consiglierei far seguire al metodo del Telemann un esame diretto delle feci perchè possa servirci di controllo nella diagnosi.

b) *Metodo delle soluzioni saline di Bass*. — Una certa quantità di feci, che si sospettano infestate, si stemperano in una provetta con una soluzione satura di sale comune; si agita quindi ben bene e poscia si lascia depositare. Le uova di parassiti, se esistono, verranno a galla a causa del loro peso specifico minore.

Invece del sale comune può usarsi il cloruro di calcio sciolto in quantità tale che si raggiunga il peso specifico di 1.25.

c) *Metodo dell'adesione* (Pepper). — Le feci lavate, lasciate sedimentare e decantate, vengono distese su una lastra di cristallo od anche un semplice porta-oggetti. Si tiene il cristallo in riposo per qualche minuto poscia si immerge delicatamente in acqua. Quando tutto è ben lavato, osservando al microscopio, si trovano le uova aderenti alla lastra. Questo metodo adope-

rato dall'autore per le uova dell'Anchilostoma non dà buoni risultati per le uova di altri Nematodi. Segno evidente che la proprietà di aderire è esclusiva a quel parassita.

Qualunque metodo si segua se la quantità di uova è assai scarsa, si corre il rischio di cercare a lungo nello stesso preparato microscopico senza che lo sguardo giunga sull'esemplare che forse unico si trova nel vetrino.

Per evitare ciò si potrebbe usare il tavolino traslatore: esso ci permette di scorrere agevolmente tutto il campo del preparato. Ma l'uso di questo apparecchio non solo porta via molto tempo, ma, essendo esso delicatissino, le viti micrometriche si sciupano assai facilmente. Si ovvia facilmente a questi inconvenienti, e si ottengono risultati ugualmente sicuri, per mezzo d'un vetrino millimetrato (fig. 408) che è alla portata di tutti e che economizza insieme spesa e tempo. Chiunque può ottenerlo facilmente nel seguente modo:

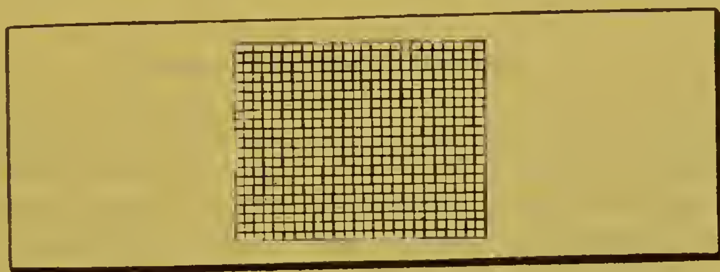


Fig. 408. — Vetrino millimetrato per la ricerca delle uova nelle feci.

Si prende un comune vetrino porta-oggetti e vi si disegna sopra, con inchiostro di Cina ben denso ed una penna molto sottile, un reticolato le cui maglie abbiano un millimetro di lato. In questo modo ogni millimetro quadrato corrisponde circa al campo microscopico che dà l'oculare 4 e l'obbiettivo 2 Koristka.

Perchè l'inchiostro di Cina non si spanda sul cristallo si spalma precedentemente il porta-oggetti con una soluzione di balsamo del Canadà in xilolo, poscia, perchè non si cancelli il disegno, quando è asciugato, col comune balsamo del Canadà, vi si appiccica un copri-oggetti della stessa grandezza del porta-oggetti, oppure un altro porta-oggetti e si attende, prima di adoperarlo, che i due vetri abbiano fortemente aderito. Questo vetrino ci permetterà di far passare successivamente sotto l'occhio tutti i quadratini e contarci le uova contenute in ciascuno di essi: queste appariranno tanto più nettamente quanto più ristretta sarà l'apertura del diaframma.

Gli stessi metodi di ricerca suggeriti per l'esame delle feci debbono usarsi per tutte le altre sostanze più o meno liquide o compatte che contengono parassiti od elementi parassitari (secrezioni nasali, catarro bronchiale, vomito, sperma, muco vaginale, pus, cerume, sevo, ecc.). Tutte debbono rendersi uniformemente liquide in modo da poter essere esaminate agevolmente.

2° Parassiti viventi in una sostanza liquida raccolta in cavità chiusa.

Per quei parassiti che vivono in una sostanza liquida raccolta in cavità chiusa (liquido peritoneale, articolare, cefalorachidico, cistico, ecc.) non varia che il modo di prelevamento. Questo, a meno che non si ricorra ad un atto operativo, deve essere fatto per mezzo di punture esplorative praticate con aghi e siringhe adatte al singolo caso, seguendo la più scrupolosa antisepsi.

Il liquido estratto, diluito con soluzione fisiologica, fortemente agitato e lasciato decantare o centrifugato, viene poi attentamente osservato al microscopio prelevandone con una pipetta piccole quantità dal fondo. I parassiti o le uova che in esso si trovano verranno trattati con gli stessi metodi consigliati per quelli rinvenuti nelle feci.

3° Parassiti viventi ne' tessuti.

Molti di essi sono abbastanza grandi da essere veduti ad occhio nudo (Cisticerchi, larve di Mosche, Filarie, ecc.) e possono essere isolati e catturati assai facilmente. Altri invece più piccoli debbono essere messi in evidenza con l'aiuto del microscopio. Possono farsi allora preparati a fresco oppure permanenti. Nel primo caso si prende una piccola porzione di organo o di tessuto sospetto e sotto ad un microscopio semplice si dilacera con aghi su di un vetrino in mezzo ad acqua fisiologica e si isolano i parassiti. Ciò fatto si copre il tutto con il copri-oggetti e si osserva a maggiore ingrandimento.

Nel secondo caso, sopratutto quando si vogliano anche studiare le lesioni anatomo-patologiche prodotte dai parassiti stessi, è necessario ricorrere a tutte le ordinarie manipolazioni di tecnica istologica, quali la fissazione, impregnazione, inclusione, sezioni, colorazioni, ecc.

Per isolare poi e raccogliere gli Acari psorici, quelli cioè che scavano gallerie o che vivono in mezzo alle croste, è necessario agire diversamente secondo la sede dei singoli parassiti. Le femmine che vivono in fondo al cunicolo si metteranno in evidenza solo con la lacerazione di quella piccola eminenza cutanea vescicolare che costituisce il fondo cieco della galleria nel quale esse vivono. Per raccogliere invece i maschi, le larve e le ninfe, che vivono sotto le croste, occorre raschiare la cute, prelevare una buona quantità di queste e rammollirle con soluzione di potassa caustica (10-15 %).

Gli Acari saranno messi in libertà; si laveranno ripetutamente ed abbondantemente in acqua distillata e poscia si passeranno in alcool dal quale si toglieranno in seguito per farne preparati permanenti.

Per quanto riguarda l'esame del sangue vedi *Protozoologia*.

Preparazione degli Elminti. — *Pulizia.* — È assolutamente necessario procedere con la massima cautela alla pulizia degli esseri che abbiamo raccolto. Il non farlo sarebbe grave errore giacchè una volta avvenuta la fissazione ciò non potrebbe più farsi e i detriti di sostanza eterogenee, che possono trovarsi alla superficie del loro corpo, attorno o dentro la bocca impedirebbero di scorgere alcuni particolari il più delle volte assai necessari per fare delle diagnosi esatte.

I grossi Nematelminti (Ascaridi, Echinorinchi, ecc.) ed i grossi Cestodi e Trematodi, come pure le larve di Mosche, ecc., si puliscono assai facilmente con adatti pennelli, avendo cura di spazzolare adagio adagio tutta la superficie del loro corpo in tutti i sensi ed operando sempre sotto l'acqua.

I piccoli Trematodi e la maggior parte di Nematodi mediocri o piccoli si rendono perfettamente nitidi con l'agitazione. Si raccolgono entro una provetta piuttosto grande ripiena di soluzione fisiologica e si agitano violentemente per qualche minuto: poscia si lasciano calare al fondo e, decantato il liquido, si ripete il lavaggio con nuova soluzione fino a che il liquido sia perfettamente limpido.

Durante questa operazione vedremo i Vermi distendersi e liberarsi completamente di tutte le impurità che ad essi erano aderenti.

Uccisione e fissazione. — Ciò fatto si uccidono e si fissano in modo diverso:

I Cestodi ed i Trematodi è preferibile ucciderli e fissarli o in alcool oppure in una soluzione di formolo (5 %). È necessario aggiungere tanto l'alcool quanto il formolo gradatamente perchè non avvenga contrazione e deformazione del Verme stesso. Il liquido fissatore deve sostituirsi poco a poco all'acqua fisiologica avendo cura, specialmente se il Cestode è grande (Tenie, Botriocefali, ecc.), che il recipiente contenga molto liquido ed il Verme non si resti pigiato. Una volta uccisi e fissati si passano in un vaso con alcool ad 80° ove possono rimanere per un tempo indefinito purchè il vaso sia ben chiuso ad il liquido non evapori.

Per la fissazione di tali Vermi quando si vogliano fare sezioni istologiche consiglierei usare la soluzione satura di sublimato, preferibilmente a caldo, avendo l'avvertenza di tener compresso il Verme intero, se possibile, oppure i frammenti fra due lamine di vetro strette da un filo od anche da piccole molle di legno come quelle che si usano per appendere la biancheria. Dopo qualche ora l'animale è perfettamente fissato e non resta altro che togliere il sublimato con lavaggi accurati di alcool iodato.

I Nematodi grandi si uccidono sia col metodo suggerito più sopra per i Cestodi, sia anche con l'alcool bollente; quei piccoli invece, è preferibile trattarli nel modo seguente: dopo averne fatta accuratamente la pulizia si rinnova la soluzione fisiologica, si torna e si seguita ad agitare fortemente sostituendo poco per volta a quella di cloruro di sodio una soluzione satura di sublimato corrosivo. Allora si vedrà che essi cessano di agitarsi e muoiono per la massima parte in perfetta distensione.

Conservazione. — Una volta uccisi si tengono immersi in sublimato fino a che abbiano assunto una colorazione bianco-opaca, poi si lavano ripetutamente ed a lungo dapprima in alcool iodato, fino a che questo non si decolora più, poscia in alcool fin che i Vermi, cedendo il colorito giallo dello iodio, abbiano riacquistato il colorito bianco caratteristico.

Così preparati si conservano permanentemente in alcool a 90° oppure in una miscela di alcool cui si sia aggiunta a poco a poco una metà circa di glicerina tridistillata od anche di lattofenolo di Amann (1). Nell'un caso o nell'altro si vedranno dapprima deformarsi e raggrinzarsi ma in seguito,

(1) Glicerina due parti, acqua distillata una parte, acido fenico cristallizzato una parte, acido lattico una parte.

quando la glicerina sarà penetrata all'interno, torneranno a riprendere l'aspetto e la forma primitiva e si presenteranno perfettamente trasparenti e induriti in modo che lo studio di essi potrà agevolmente farsi senza ricorrere ad altre manipolazioni speciali. Con questa miscela si ovvierà anche al grande inconveniente di far rimanere all'asciutto il parassita, quando avvenisse l'evaporazione dell'alcool.

Montatura. — Buoni preparati permanenti possono ottenersi sia montando i parassiti, così conservati, direttamente in glicerina o in lattofenolo puri, fissando poi il coprioggetti tutto intorno con la gelatina glicerinata (1) che volta per volta si scalda a bagnomaria fino a fusione, sia adoperando il liquido del dott. Giovanni Faure (2) assistente all'Istituto Botanico di Roma.

Questo liquido offre il grande vantaggio di servire benissimo come chiarificante e nel tempo stesso, divenendo solido in breve tempo, fissa il coprioggetti, sostituendo ottimamente il balsamo del Canadà che è poco consigliabile per i vermi, i quali, dato lo spessore e la natura della cuticola, che non permette ai vari reagenti di penetrare nell'interno, assai spesso si disidratano incompletamente e si sciupano col passaggio nei diversi liquidi.

Usando questo liquido è bene tener presente che le preparazioni conservate in alcool vanno prima lavate ben bene in acqua distillata.

Con questo metodo io monto permanentemente non solo tutti i piccoli Vermi ma anche le uova e le stesse larve de' parassiti che eventualmente posso riscontrare nelle feci, negli organi o nei tessuti.

Chè se poi volessero farsi dei vari Elminti delle inclusioni per sezioni istologiche sarebbe indispensabile praticare qualche incisione alla cuticola per poterli disidratare e sopratutto per permettere alla paraffina di penetrare nell'interno.

(1) Far gonfiare per una notte una parte di gelatina (colla di pesce purificata) in sei parti d'acqua, poi si fonde a bagnomaria e si filtra al vetro, quindi si aggiunge glicerina parti 7.

(2) Acqua distillata cmc. 100, cloralio idrato gr. 100, cloridrato di cocaina gr. uno, glicerina cmc. 40, gomma arabica purissima gr. 60.

Si scioglie il cloralio e poi la cocaina nell'acqua, si aggiunge poi la glicerina ed in ultimo la gomma ben polverizzata. Si agita il recipiente fino a completo scioglimento della gomma. Si lascia in riposo qualche giorno, si agita e si passa attraverso a cotone idrofilo o a lana di vetro o meglio a carta da filtro.

ERRATA-CORRIGE.

Pag. 1019, Fig. 301. Invece di: *Opistorchis felineus*, leggi: *Dicrocoelium lanceatum*.

(Finito di stampare l'8 novembre 1911).

A. CELLI

PROTOZOOLOGIA.

PROTOZOOLOGIA.

PARTE GENERALE.

Lo studio dei protozoi patogeni cominciò prima che quello dei batteri patogeni.

Nel 1837 il Donné descrisse in mezzo al muco della vagina il *Trichomonas vaginalis*. Nel 1841 il Valentin trovò il primo tripanosoma nel sangue della trota, e nel 1843 il Gruby scoperse il *Trypanosoma sanguinis* nelle rane e il Miescher i sarcosporidi; nel 1855 il Cornalia trovò i suoi corpuscoli nella pebrina del baco da seta, e su questa malattia e sul modo di preservarne l'industria, fin dal 1867, il Pasteur faceva i suoi famosi studî. Nel 1877-78 il Woronin trovava nei tumori delle radici della rapa la *Plasmodiophora brassicae;* nel 1878 il Lewis rinvenne il primo tripanosoma dei mammiferi del sangue dei ratti; nel 1878-79 Rivolta e Leuckart iniziavano le ricerche sui coccidi del coniglio; nel 1879-80 il Laveran facea sugli ematozoari della malaria le sue prime e fondamentali osservazioni, alle quali seguirono quelle di Marchiafava e mie, dal 1882 in poi, e nel 1887-88, quelle del Danilewski sugli ematozoari dei vertebrati inferiori.

Nell'ultimo venticinquennio si è raccolta man mano una letteratura sempre più vasta, che oggi ha i suoi periodici (1), e i suoi trattati di Protozoologia generale e speciale, come sugli Sporozoi, sui Pirosomi, sui Tripanosomi.

Nell'esporre questo compendio, ad uso dei medici, mi occuperò quasi esclusivamente e a grandi tratti dei *soli protozoi patogeni per l'uomo, e pei mammiferi nostrani più utili.*

(1) *Archiv für Protistenkunde*, iniziato dallo SCHAUDINN.

***

I protozoi sono esseri unicellulari; la loro grandezza varia da pochi μ ad alcuni centimetri. La loro struttura è quella di una cellula: hanno quindi protoplasma, uno o più nuclei e membrana. Questa però in alcune condizioni di vita endocellulare e libera può non aversi.

Il protoplasma è granuloso ovvero jalino, omogeneo, e secondo queste varie condizioni si colora più o meno con gli speciali reagenti.

La sostanza nucleare può essere diversamente distribuita nel protoplasma: cioè può essere raccolta in un unico nucleo; ovvero in un nucleo principale o macronucleo e in uno secondario o micronucleo, che ha grande importanza biologica; o può essere diffusa irregolarmente oppure in forma di un reticolo di granuli o aghi di cromatina.

Macro- e *micronucleo* sono due specie di nuclei che non si trovano differenziati nei coccidi, in alcuni emosporidi e negli infusori ciliati.

Invece nelle gregarine il nucleo si differenzia nelle due parti suddette, morfologicamente e fisiologicamente distinte. Il macronucleo è più grande, ha la struttura dei nuclei ordinari delle cellule ed ha funzione vegetativa. Il micronucleo è piccolo come un semplice globulo cromatico, per lo più situato in una anfrattuosità del macronucleo, e solo al momento della coniugazione presenta la struttura caratteristica d'una cariocinesi abbreviata, cioè fili distinti in parti acromatiche e in parti cromatiche. Ha quindi funzione importante nella moltiplicazione.

In altri protozoi (tripanosomi, ecc.) il micronucleo ha una importante funzione cinetica pei movimenti interni ed esterni del protoplasma. Perciò è detto anche *blefaroplasto* (Schaudinn) o *centrosoma* (Laveran e Mesnil).

Si presenta come un corpuscolo molto cromatico, formato di sostanza più o meno analoga alla cromatina nucleare, situato o direttamente nel protoplasma cellulare, ovvero al centro di una sfera di sostanza speciale detta sfera attrattiva. Può, talora, includere al centro un granulo più colorato detto *centriolo*.

Anche il macronucleo può presentare un nucleolo o *cariosoma*.

I singoli aghi o granuli di cromatina, quando fanno parte di una struttura nucleare si dicono *cromosomi;* quando invece sono sparsi pel protoplasma si dicono anche *cromidi*. Questi sarebbero di due specie: gli uni in rapporto col ricambio materiale (cromidi propriamenti detti, o cromidi funzionali); gli altri con la funzione riproduttiva e sono i cromidi sessuali o *sporezi*.

Nei protozoi più minuti uno o più granuli di cromatina rappresentano tutto il nucleo.

Il protoplasma, prendendo le mosse da questi centri di sostanza nucleare, e per mezzo di piccoli organi od organoidi, esercita varie funzioni vitali, come sensibilità, movimento, nutrizione, resistenza nell'ambiente, sviluppo e, fino a un certo limite, riproduzione.

Ad esempio la *sensibilità* e il *movimento* si manifestano:

a) per mezzo di contrazioni e deformazioni di tutto il corpo;

b) per mezzo di pseudopodi; cioè il corpo cellulare emette prolungamenti o gettoni per cui il protozoo cambia continuamente di forma. e quando si fa immobile diventa rotondeggiante;

c) per mezzo di flagelli, che imprimono al corpo del protozoo il movimento di traslazione, certe volte assai vivace, come nei tripanosomi, ne' quali il flagello, in forma di filamento cromatico, si continua per tutto il corpo, lungo il bordo di una membrana ondulante;

d) per mezzo di una sola membrana ondulante come nelle spirochete;

e) per mezzo di ciglia, che alla periferia di una parte o di tutto il corpo, come nel *Balantidium coli*, con le loro vibrazioni rapidissime imprimono il movimento di locomozione;

f) per mezzo di fibrille contrattili, come nei ciliati.

La *nutrizione* si compie in alcuni protozoi per tutto il protoplasma che incorpora le sostanze nutritive o le assorbe per osmosi, ovvero si localizza in uno o più vacuoli digestivi: il residuo della digestione è fatto da granuli di aspetto e composizione chimica differente, che sono emessi all'esterno. I vacuoli digestivi non si debbono confondere coi vacuoli contrattili che servono ad espellere i materiali di rifiuto, e forse anche ad una circolazione rudimentale.

In altri protozoi più evoluti una parte del protoplasma acquista la funzione di polo boccale (citostoma), da cui sono attratte le sostanze nutritive e introdotte nel corpo cellulare; al polo boccale può corrispondere un polo anale (citopigio), per l' emissione dei materiali di rifiuto.

Nei protozoi ancora più evoluti gli organoidi della nutrizione si differenziano maggiormente fino ad aversi dei veri e propri apparati succhiatori, come, ad esempio, nei suctorii, provvisti d'una specie di calice, circondato da tante appendici le quali si attaccano, a mo' di ventosa, sulle sostanze da ingerire. Cosicchè dalle più semplici forme di funzione nutritiva si passa gradatamente a quelle più differenziate.

La *riproduzione* può essere asessuale (monogonia, schizogonia) e sessuale (anfigonia o sporogonia): sempre vi prende una parte importantissima la cromatina che si suddivide e si diffonde in tante particelle che fanno come da polo di attrazione delle nuove masse protoplasmatiche.

La riproduzione asessuale si compie per divisione regolare, che può essere o longitudinale, o trasversale, o per gemmazione, a figure o lobi simmetrici, per esempio a rosetta; ovvero si compie per divisione irregolare: in ogni modo fino a che il parassita rimane dentro lo stesso ospite, può ripetersi a lungo, per molte e molte successive generazioni.

Nella riproduzione sessuale si può avere: o l' autogamia, cioè la divisione del nucleo in due parti che poi si fondono in un nuovo nucleo, come in alcuni flagellati; ovvero la copulazione di due esseri presso a poco uguali, cioè isogamia; ovvero la copulazione di due esseri ben diffe-

renziati sessualmente, cioè eterogamia. In tale ultimo caso, come ad es. nei coccidi e negli emosporidi, si hanno: il protozoo maschile, o microgametocito, con gli spermatozoi o microgameti, e il protozoo femminile, o cellula-uovo, o macrogamete. Questo viene circondato da microgameti, dei quali uno solo penetra nella cellula femminile, compiendone la fecondazione; dopo di che si ha una moltiplicazione e suddivisione della cromatina, cioè una proliferazione polinucleare e in definitiva la genesi di tanti esseri nuovi. Un esempio tipico di questa riproduzione sessuale lo incontreremo nei coccidi e negli emosporidi.

Talora la riproduzione sessuale avviene anche mediante uno scambio di sostanze fra nucleo maschile e femminile (coniugazione).

In ogni modo, finchè il parassita permane dentro lo stesso ospite si riproduce per lo più indefinitamente per monogonia; ma se lo abbandona per entrare in un altro ospite, allora compie il suo sviluppo, e assicura la specie, mediante la sporogonia; si ha cioè la generazione alternante.

Vita nell' ambiente o in un ospite. — Son numerosi i protozoi che possono fare una vita libera nell'ambiente, come nei liquidi e nei luoghi molto umidi; e se incontrano condizioni a loro sfavorevoli, per esempio il disseccamento, allora si circondano, per resistere, di una membrana segregata dal protoplasma, ed entrano così nello stadio cistico. Ma questo, di solito, non è il caso dei protozoi patogeni. Essi sono entozoi, vivono cioè dentro altri esseri. Ma non tutti gli entozoi sono parassiti; altri invece sono simbionti, ed altri semplici commensali; i simbionti vivono, è vero, a spese dell'ospite, ma emettono anche sostanze che riescono utili ed assimilabili per l' organismo entro cui dimorano; i commensali invece vivono, per esempio, nell'intestino a spese della materia nutritiva grezza, cioè non ancora elaborata dall'ospite, ovvero a spese delle sue sostanze di rifiuto.

Gli entozoi parassiti si nutrono della materia viva dell' organismo dell'ospite, per es., del protoplasma cellulare, oppure dei succhi nutritivi, resi cioè assimilabili dall' ospite stesso, e necessari perciò alla sua esistenza. In tal modo essi riescono oltremodo nocivi così alle cellule, come ai tessuti ed agli organi.

Fra gli entozoi parassiti che vivono a spese della cellula, ve ne sono di quelli che hanno nella cellula stessa varia sede d' elezione. Alcuni (*Kariophagus*) vivono a spese del nucleo, altri a spese del protoplasma.

Entoparassiti dei tessuti sono invece quelli che vivono, per esempio, nel derma e nel sangue: tra questi ultimi l'emosporidio della malaria dell'uomo vive nei globuli rossi e nel plasma.

Fra gli entoparassiti degli organi ve ne sono di quelli che vivono in mezzo agli enzimi dei succhi digestivi senza esserne toccati. Per spiegare questa resistenza si può supporre che gli entozoi elaborino antienzimi che neutralizzino gli enzimi digerenti e gli altri enzimi organici: la questione però è ancora controversa, e si riannoda con quella della autodigeribilità o non dello stomaco.

Azione patogena confrontata con quella dei batteri. — Molte delle alterazioni che derivano dai protozoi rientrano nel campo della vera patologia cellulare. Ogni protozoo che vive a spese di una cellula v' induce una malattia. Se l'invasione protozoaria è limitata, in una parte del corpo, a un gruppo di cellule, si può avere un tumore, o un'altra malattia locale: se invece è generalizzata a cellule così diffuse come sono i globuli rossi, ne viene una infezione generale qual' è la malaria. In questi casi l' azione patogena è diretta o immediata dal protozoo alla cellula ospite.

Ma si potrebbe avere anche un' azione patogena indiretta, quando cioè il protozoo segregasse materiali tossici. Quest' ultima è la maniera per la quale esercitano principalmente la loro azione patogena i batteri; ma non è ancora sicuramente dimostrata pei protozoi, che fin oggi non è certo se riescano a produrre sostanze tossiche.

Delle proteine dei protozoi si è supposta l' esistenza per ispiegare certi speciali effetti patologici in alcune infezioni protozoarie; ma si è tentato finora isolarle soltanto da protozoi così grossi come i sarcosporidi, o protozoi delle carni, triturando i quali si è avuto un estratto acquoso e glicerico, che inoculato riesce tossico letale in proporzione di 5 milligrammi di sostanza fresca per 1 chilogramma di peso di coniglio, e dà sintomi coleriformi, mentre in piccole ripetute dosi conduce alla cachessia.

È da notare però che effetti simili si hanno anche inoculando alcuni tessuti fisiologici, come la tiroide.

Quanto a tossine secrete dai protozoi, si è parlato, ad es., di pirotossine della malaria; ma non potei dimostrarle neppure raccogliendo, da molti malarici, grandi quantità del siero del sangue ne' vari periodi dell'accesso febbrile, e inoculandole poi anche dentro le vene.

Una sola esperienza di autori americani (Rosenau, ecc.), nella quale dopo la inoculazione di siero del sangue terzanario, filtrato alla candela Chamberland, si ebbe cefalea, brivido, vomito, calore per 2 ore a 38°.7 e poi sudore, non dimostra abbastanza la tossina malarica nel sangue, dappoichè fenomeni simili si possono talora produrre con la semplice iniezione di sieri terapeutici.

E nemmeno dal coefficiente urotossico delle urine dei malarici si è ricavata alcuna prova certa d'una simile pirotossina.

È poi dimostrato che si possono avere febbri alte con pochi e scarsi parassiti nel sangue e viceversa.

Lo stesso dicasi del meccanismo della febbre nell'infezione da tripanosomi. D'altronde è ancora sempre oscura eziandio nelle infezioni batteriche la patogenesi della febbre. E neppure sono dimostrate altre eventuali tossine dei protozoi, che potrebbero spiegarci la cachessia caratteristica della infezione malarica, e di altre infezioni protozoarie; come non si sa nulla dei prodotti tossici che possano derivare dalle necrosi cellulari causate dai protozoi.

Le emolisine, finalmente, parrebbe ovvio ci fossero almeno nelle infezioni protozoarie del sangue, che viene certe volte a subire perdite enormi di globuli rossi; il che probabilmente si deve alla diffusione nel plasma delle emolisine che sono contenute entro gli elementi figurati del sangue in quantità molto maggiore che in quelle di persone sane (De Blasi), ma finora nel siero non si sono potute nettamente dimostrare se non, forse, nella malaria bovina, in cui è molto frequente la emoglobinuria.

Concludendo, poco o nulla si sa per ora delle sostanze tossiche, elaborate dai protozoi.

Reazione dell'ospite. — Son reazioni cellulari rivolte a neutralizzare l'azione patogena e possono essere dirette o indirette (secretive, umorali). Le prime dànno le neoformazioni cellulari o connettivali, che tendono a circoscrivere o ad incapsulare i parassiti. Se le cellule neoformate esercitino una vera e propria fagocitosi sui protozoi non è ancora dimostrato pei globuli bianchi nella infezione malarica, mentre è ovvia nelle leishmaniosi e in certi casi di tripanosomiasi, in cui pur si vedono i leucociti inglobare gli ematozoi, dei quali resta fuori soltanto il flagello che continua i suoi movimenti vorticosi.

La reazione umorale dell' organismo contro i batteri si manifesta, com'è noto, mediante la produzione di sostanze agglutinanti, precipitanti, battericide e antitossiche in genere, come antiemolisine, antileucocidine, antitossine, ecc.

Nell'infezione da pirosomi si ha immunità sia artificiale, sia consecutiva alla malattia guarita, senza però la scomparsa dei parassiti dal sangue circolante.

Nell' infezione da tripanosomi una reazione agglutinante c'è, ma è leggera ed incompleta, giacchè mentre una porzione di questi protozoi si raggruppano fra loro, altri, alla periferia della zona di agglutinamento, rimangono mobili.

Con estratti di alcuni tripanosomi, isolati dal sangue mediante la centrifugazione, si riuscirebbe ad ottenere, nel cane, la comparsa di precipitine specifiche.

Si ha pure nella tripanosomiasi un'immunità attiva in seguito alla guarigione, o alle inoculazioni sperimentali di sangue virulento; ma col siero di animali così preparati è debole o incerta l'immunizzazione passiva, preventiva e curativa. Di più in queste immunizzazioni naturali o artificiali non si producono vere protozoocidine, protozoolisine. Anzi alcuni emoprotozoi sono sieroparassiti, altri (pirosomi, tripanosomi) permangono nel sangue di animali anche immunizzati, e, inoculati, riescono a infettare animali sani.

Nulla sappiamo ancora di eventuali sostanze antitossiche ed antiemolitiche.

Sicchè verso i protozoi come verso i batteri si può avere un'immunità naturale o congenita, un'immunità acquisita dopo sofferta la ma-

lattia nonchè un'immunità artificiale però in grado debole, e non trasmissibile passivamente.

Anticorpi dimostrabili con la reazione di fissazione del complemento (reazione di Bordet-Gengou) sono stati dimostrati da alcuni autori in alcune tripanosomiasi. La reazione di Wassermann che si osserva talora nel siero dei malarici non ha certamente nulla a che fare con anticorpi specifici.

Si può dire in ogni modo che molto probabilmente il meccanismo dell'azione patogena e della immunità nelle malattie da protozoi è analogo, ma non identico al meccanismo studiato nelle malattie da batteri.

Autodegenerazioni: consistono in vacuolizzazioni e successive disgregazioni dei protoz i (che certe volte possono simulare una moltiplicazione per scissione) e ci spiegano la guarigione spontanea di un processo infettivo da essi determinato. Così, ad esempio, si disgregano e muoiono le forme sessuali de' plasmodi malarici, che nel sangue circolante e negli organi dell'uomo non trovano più le condizioni di vita, che trovano invece passando nello stomaco delle zanzare.

Vita nell'ospite definitivo. — Qui si ha lo sviluppo completo, fino alla nuova trasmissione nel primo ospite, cioè d'ordinario in un animale superiore. Anche quando è ben conosciuto l'ospite definitivo, non sempre si conoscono intimamente le varie fasi di sviluppo del protozoo; e anche quando queste si conoscono, come ad esempio, per la malaria degli uccelli e dell'uomo, non sappiamo ancora per quale meccanismo intimo specie affini e le specie stesse che sono capaci di ospitarlo e coltivarlo, possono pure, in date condizioni, impedirne lo sviluppo.

Generalmente nell'ospite definitivo lo sviluppo ha luogo dentro certi organi (stomaco, intestino, tuboli malpighiani), nei succhi organici e fra le cellule dei tessuti.

Può aversi però lo sviluppo anche nelle uova, onde la

Ereditarietà delle malattie da protozoi. — Mentre per le malattie da batteri non avviene mai la penetrazione attiva dei germi specifici dentro cellule viventi, e quindi si può escludere la contaminazione della cellula-uovo e l'ereditarietà nel senso vero e proprio della parola, invece ne abbiamo dei tipici esempi nelle malattie da protozoi, che sono parassiti delle cellule. Quello della pebrina è il caso più anticamente conosciuto, che ha condotto il Pasteur alla mirabile selezione delle uova dei bachi da seta. Oggi, fra gli emosporidi, conosciamo la trasmissione ereditaria delle piroplasmosi nelle zecche, capaci di propagare da madre a figlia, attraverso le uova, la cosidetta malaria dei bovini, ovini e cani, mantenendo in questo ed unico modo l'infezione nei luoghi contaminati. Così in queste zecche, come in quelle propagatrici delle spirochetosi, i piroplasmi, e rispettivamente le spirochete, penetrano dentro le stesse cellule-uovo.

Secondo alcuni autori potrebbe talora trasmettersi anche la infezione malarica da una zanzara infetta alla prole: e così pure il virus della

febbre gialla (che alcuni ammettono essere un protozoo) potrebbe da una zanzara infetta essere trasmesso ereditariamente.

È nota la trasmissione ereditaria del treponema della sifilide: ed è stato anche osservato come le glandole sessuali dei feti eredosifilitici possano essere infette da treponemi: ciò che spiegherebbe il fatto della trasmissione della sifilide alla seconda generazione.

Chemoterapia. — Era anticamente nota l'azione specifica del mercurio e dell'iodio nella sifilide, e della chinina nella malaria. Recentemente per opera di Ehrlich e della sua scuola furono fatti studi molto interessanti sulla azione elettiva specifica che alcune sostanze chimiche, specialmente varie sostanze coloranti derivate dall'anilina, e vari composti arsenicali, esercitano su certi protozoi. Da una simile terapia medicamentosa varie infezioni protozoarie causate da tripanosomi, da spirocheti e da treponemi risentono un notevole vantaggio: sì che nel campo dei protozoi una *chemoterapia* specifica potrebbe sostituire la *immunoterapia* delle infezioni batteriche. È interessante che talora uno stipite di protozoi, per esempio di tripanosomi, può divenire refrattario alla azione per lungo tempo protratta di una determinata sostanza medicamentosa: tale refrattarietà è trasmissibile ereditariamente per modo che si possono creare delle razze di tripanosomi resistenti a questo o a quel medicamento (v. anche vol. II, pag. 838).

METODI DI RICERCA DEI PROTOZOI.

Preparati a fresco.

Sono da preferirsi specialmente per fare una rapida diagnosi sommaria e per vedere il movimento ed altri processi biologici dei protozoi che si studiano. Si possono fare dal sangue senza alcuna aggiunta, avvertendo solo che copri- e portaoggetti siano pulitissimi, e perciò prima passati in acido idroclorico, e successivamente in etere od alcool, e poi conservati al di fuori della polvere. Per la pronta diagnosi degli ematozoari è questo ancora sempre il metodo più sbrigativo e spesso più utile.

Notisi però che il sangue malarico deve essere schiacciato, coprioggetti contro portaoggetti, sopra un panno o una carta bibula, che assorbano il sangue in eccesso. Torna comodo perciò tenere già porta- e coprioggetti preparati e puliti entro carta sugante.

Altre volte ai materiali freschi (fegato, intestino, ecc.) si può aggiungere la soluzione fisiologica di cloruro di sodio (0.75 %), o una soluzione di citrato e di cloruro sodico (ana 0.50 %).

Giova talora, specialmente per l'esame a fresco dei tripanosomi, tener distaccato con piccoli sostegni il coprioggetti dal portoggetti, o esaminare su portaoggetti concavi a goccia pendente. Quando i parassiti sono liberi nel siero (tripanosomi) e molto scarsi è utile far precedere la centrifugazione del sangue o del liquido cerebrospinale.

Per l'esame a fresco dei treponemi giova osservarli in campo oscuro mediante alcuni speciali apparecchi (condensatore a specchi, paraboloide ecc.), de' quali v. *Microscopia* pag. 806.

Per vedere meglio i processi vitali a fresco può essere utile anche il tavolino riscaldato mediante circolazione di acqua calda. Se ne hanno diversi modelli. Il migliore è quello del Reichert (fig. 409), tutto in metallo, tranne la parte centrale C, colle viti A, A' per fissarlo al tavolo dei microscopio,

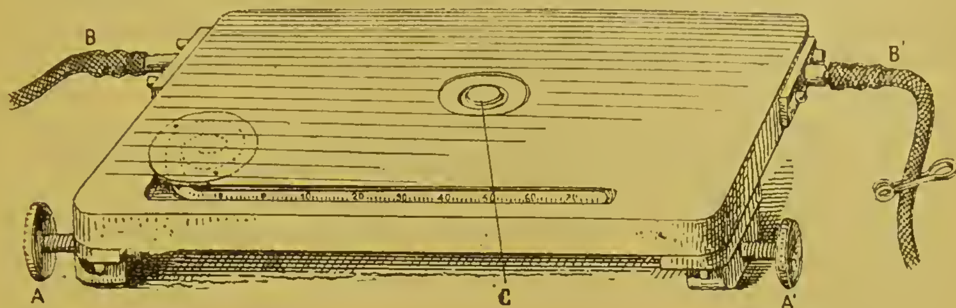


Fig. 409. — Tavolo riscaldante di Reichert.

coi tubi B, B' per fare entrare ed uscire l'acqua riscaldata. Questa si può riscaldare facendola passare attraverso un serpentino piatto, riscaldato per mezzo di una fiamma a gas opportunamente regolata. La temperatura viene indicata dal termometro, quale si vede nell'orlo anteriore del tavolino stesso.

Colorazione vitale.

Pel sangue si ottengono buoni risultati col turchino di metilene sciolto in liquido ascitico (Celli e Guarnieri), o col metodo seguente: sull'orlo di un vetrino coprioggetti si mette una piccola goccia di soluzione acquosa satura di turchino di metilene: indi si fa combaciare quest'orlo con la superficie di un altro coprioggetti in modo da formare un angolo acuto, e così strisciando si distende il liquido colorante in uno strato sottilissimo e si fa essiccare. Su questo vetrino così preparato si pone una goccia di sangue, che poi si rovescia e si schiaccia su di un portoggetti: il preparato infine si circonda di vaselina o di paraffina.

Per conservare il sangue a fresco bisogna raccoglierlo asetticamente, defibrinarlo o mescolarlo con acqua citro-clorurata per impedirne la coagulazione.

Preparati a secco e colorazioni.

a) *Raccolta del materiale.* — Anzitutto bisogna fare la più scrupolosa pulizia dei vetrini, come sopra si è detto.

Per avere strati sottili, si prende il materiale (sangue, muco, ecc.) coll'orlo di un coprioggetti, e con quest'orlo si striscia a man leggera su altri coprioggetti o su portaoggetti, l'un dopo l'altro.

Per la colorazione in massa del sangue malarico, Ross consiglia, quando i parassiti son pochi, di prendere uno strato grosso di sangue, e poi dopo disseccato, liberarlo con acqua distillata dalla emoglobina che occulterebbe la vista dei parassiti: questi, dopo la colorazione, si vedono bene, specialmente se appartengono alle forme più grosse. In tal caso però può servire per la diagnosi anche uno strato spesso di sangue a fresco.

Invece dell'acqua distillata si può adoperare, per disciogliere l'emoglobina, anche l'acqua acidulata con acido acetico.

Conviene però sempre ricorrere prima alla

b) *Fissazione.* — La fissazione del sangue sul copri- o portoggetti si può fare col disseccamento all'aria (alla lampada per lo più nuoce) e poi in alcool assoluto per 15 minuti, o in miscela di alcool assoluto ed etere a parti uguali, per 2-5 minuti, o in alcool metilico puro per 2-3 minuti o in altri liquidi che volta a volta furono sperimentati.

Per la dimostrazione dei nuclei riesce eccellente fissare il sangue nel liquido di Apaty (sublimato 7 parti, soluzione acquosa di *NaCl* all'1 % ed alcool assoluto ana parti 100).

Quando lo strato di sangue è spesso, dopo la fissazione in alcool assoluto, si può disciogliere l'emoglobina mediante una soluzione di acido acetico all'1 %.

Per la fissazione di altro materiale (muco, contenuto intestinale, ecc.), conviene usare il sublimato acetico (soluzione acquosa concentrata di sublimato cmc. 100, alcool assoluto cmc. 50, acido acetico goccie 5): dopo 10 minuti di azione, si lava per altri 10 minuti il preparato in alcool jodato e poi in alcool comune, e poi si colora, come diremo, per esempio in ematossilina di Grenacher.

In alcuni casi è molto utile fissare il materiale disteso sui vetrini prima che esso si essicchi. A tale scopo giova esporre lo strisciamento ancora fresco ai vapori di una soluzione di acido osmico 1 %.

I numerosi metodi di colorazione usati per lo studio dei protozoi, si possono dividere in tre categorie. Alla prima appartengono quei metodi nei quali si fa uso di una unica sostanza colorante; alla seconda quelli nei quali si adoperano *successivamente* due soluzioni coloranti che agiranno, a seconda della affinità elettiva, su questa o su quella specie di cellule o sulle singole parti di una stessa cellula; alla terza categoria finalmente si possono ascrivere tutti quei metodi nei quali, mercè la mescolanza in rapporti determinati di due sostanze coloranti, si ottiene un colore speciale, diverso da quello delle singole sostanze usate, e che viene assunto elettivamente dalle parti cromatiche nucleari dei protozoi.

I. *Colorazione unica.* — I preparati di sangue essiccati e fissati con uno dei detti metodi si colorano con uno dei seguenti liquidi:

1° turchino di metilene in soluzione alcoolica concentrata;

2° ematossilina alluminosa di Ehrlich;

3° tionina.

A tutti questi metodi è da preferirsi la colorazione col liquido di Manson che risulta di turchino di metilene al borace secondo la seguente formola:

Turchino di metilene	gr.	2
Borace	»	5
Acqua distillata	»	100

I preparati si tengono nel colore da 30 secondi a 1 minuto. I nuclei dei leucociti si colorano in azzurro violaceo scuro, i globuli rossi in azzurro verdastro chiaro, i parassiti assumono una colorazione meno pallida dei globuli.

Koch usò la stessa soluzione di Manson diluita fino a che allo spessore di un centimetro si rende trasparente.

Si può anche usare il turchino di metilene alla potassa secondo la formola di Löffler.

I preparati di sangue con tripanosomi si colorano anche bene con soluzione alcoolica di fucsina, o con soluzione di tionina fenica.

I preparati di *muco o altro liquido patologico* si possono colorare anche col carminio boracico, o con ematossilina ferrica, o con ematossilina alluminosa di Delafield o di Grenacher, o con violetto di genziana, o con safranina, ecc.

Più avanti si dirà di alcuni metodi di colorazione speciale.

Le colorazioni seguenti valgono specialmente pel sangue, e in ispecie pei protozoi parassiti del sangue.

II. *Colorazione doppia:*

1. Colorazione con turchino di metilene ed eosina:

A) soluzione acquosa concentrata di turchino di metilene;

B) eosina in soluzione alcoolica o acquosa al 2 %.

Si tengono i preparati nella soluzione *A* per 3'-4' e poi in *B* per ½-1'.

Le emazie si colorano in rosa, i parassiti e i nuclei in turchino.

2. Colorazione con ematossilina ed eosina:

nell'ematossilina per 5'-10';

nell'eosina per ½-1'.

Le emazie si colorano in rosa, i nuclei e i parassiti in violetto.

Colorazione tripla:

1. *Metodo Romanowski* (1891).

Questa colorazione tripla ha permesso di compiere moltissimi e importanti studi sulla fine struttura dei protozoi. Il Romanowski per primo dimostrò che usando i due colori di anilina, turchino di metilene ed eosina, in soluzione acquosa e mescolando in determinate proporzioni i due liquidi, si ha lo sviluppo di un terzo colore neutro, detto colore della cromatina: si prepara:

A) soluzione acquosa concentrata di turchino di metilene (10 %);

B) soluzione acquosa di eosina (10 %).

Si prendono di *A* due volumi dopo filtrazione e si mescolano a cinque volumi di *B*. La colorazione si ha in 2-3 ore.

Con questo metodo i globuli rossi si colorano in rosa, i nuclei dei leucociti in violetto-scuro, i parassiti in turchino, la cromatina in rosso violetto o carminio. Vi è l'inconveniente che molto spesso si forma un abbondante precipitato che rovina i preparati, ed è perciò che lo stesso autore usò soluzioni meno concentrate (diluite a metà); malgrado ciò i risultati sono molto incostanti, poichè spesso si debbono variare le proporzioni dei due colori fondamentali per ottenere il terzo colore, e ciò perchè le soluzioni di turchino di metilene con l'invecchiare cambiano le loro proprietà coloranti.

Il metodo originario di Romanowski perciò è stato oggetto di numerose modificazioni; le più importanti che ora vanno per le mani di tutti sono le seguenti:

2. *Metodo Giemsa.*

Questo metodo riposa su basi scientifiche ed ha su tutti gli altri il grande vantaggio che il rapporto nel quale si devono mescolare le soluzioni coloranti è ben fisso e determinato. Per averne un esatto concetto bisogna entrare un po' nel meccanismo della colorazione della cromatina.

Nocht per il primo dimostrò sicuramente che per ottenere una buona colorazione della cromatina occorre la presenza di una sostanza non chiaramente definita, che è un prodotto di decomposizione del turchino di metilene e che egli chiamò « rosso proveniente dal bleu di metilene ». Questo colore (che si può estrarre dalle soluzioni di bleu di metilene per mezzo del cloroformio che si colora in rosso) è favorito nella sua produzione dagli alcali, dal calore, dall'età della soluzione. Più tardi Michaelis e Giemsa dimostrarono che il prodotto di decomposizione osservato da Nocht è identico all'azzurro di metilene preparato per la prima volta da Bernthsen nel 1885 e che Giemsa con altro procedimento riuscì ad ottenere allo stato di grande purezza.

Questa sostanza, che va in commercio sotto il nome di Azur I, ha un prezzo molto elevato, ma la sua straordinaria potenzialità colorante non è necessaria per le comuni colorazioni dei protozoi. Giemsa consiglia di adoperare il colore chiamato Azur II, che è un miscuglio a parti uguali di Azur I e di turchino di metilene medicinale Höchst.

L'Azur II deve mescolarsi con l'eosina nel rapporto ponderale determinato di 8:5. Secondo il metodo di Giemsa si preparano due soluzioni, l'una di Azur II a 0.8 per mille, l'altra di eosina Höchst B extra solubile in acqua al 0.05 per mille e al momento di colorare i preparati, già fissati in alcool assoluto, si mescolano 10 parti della seconda soluzione con una parte della prima. La colorazione si fa durare 15-30 minuti (talora 1 ora): quindi si lava in acqua distillata.

Si ottengono in questo Istituto dei preparati finissimi e molto precisi colorando i vetrini fissati in un miscuglio di soluzione 0.8 ‰ di Azur I e soluzione 0.05 ‰ di eosina nel rapporto di 1:2 a 1:3 (Levi Della Vida).

3. *Metodo Marino.*

Accanto a questi metodi di colorazione sono importanti da conoscersi quelli basati sulla preparazione di un'unica soluzione colorante col precipitato che si forma nel mescolare il turchino o l'azzurro di metilene con un eccesso di eosina. Questo precipitato, raccolto sulla carta da filtro ed essiccato, si discioglie in alcool assoluto etilico o metilico. Su questo principio sono fondati il metodo di Reuter, quello di Leishmann e quello di Wright: e così già da molti anni si praticava nel nostro Istituto dal dottor Labranca.

Recentemente venne in commercio il bleu Marino. Esso ha l'aspetto di una polvere azzurra finissima. Lo si discioglie in alcool metilico puro nel rapporto di 0.2 per cento e si versano quattro o cinque gocce di tale soluzione sul vetrino nel quale è già essiccato, *ma non fissato*, il materiale di studio. Dopo tre-cinque minuti si allontana l'eccesso di sostanza colorante e senza lavare si versano sul vetrino otto o dieci gocce di soluzione acquosa di eosina al 0.05 per mille; dopo due-quattro minuti si lava, si asciuga e si monta. Tale metodo di colorazione è molto pratico e corrisponde ottimamente. Si avverta però che la soluzione di azzurro dopo circa due mesi, e anche prima la soluzione di eosina, si alterano: per questa sarà utile tenere una soluzione madre all'1 per mille e ogni otto-dieci giorni preparare la soluzione diluita all'1 per 20,000.

4. *Metodo di Giemsa con un'unica soluzione colorante.*

Questa soluzione colorante, che si trova in vendita da Grübler e C. a Lipsia, è così costituita:

Azur II, eosina	gr.	3.0
Azur II	»	0.8
Glicerina (chim. pura di Merck)	»	250
Alcool metilico puro (Kahlbaum)	»	250

Essa ha il vantaggio che si conserva a lungo.

I preparati, fissati in alcool assoluto per 10 minuti o in alcool metilico per 2-3 minuti o in alcool con formalina al 10 per cento per 10 secondi, si portano in un miscuglio preparato di fresco con acqua distillata e la soluzione suddetta (circa 1 goccia per ogni cmc. di H^2O), e vi si lasciano per 15-30 minuti: poi si lavano in acqua distillata e si essiccano: talvolta, per ottenere una migliore differenziazione, dopo essiccati i preparati si riportano per 2-3 minuti in acqua distillata.

Si ottengono così in breve tempo e con una assoluta certezza delle ottime colorazioni.

I preparati colorati con uno dei metodi sopra descritti devono essere montati in olio di legno di cedro, oppure in balsamo del Canadà *perfettamente neutro.*

Colture.

a) Su terreni morti. — Riescono, per le amebe abituate a vita saprofitica, e pei micetozoi, anche nei comuni terreni di coltura dei batteri.

Secondo le mie ricerche, il *Fucus crispus* è il terreno di coltura più adatto per ottenere colture pure di una data specie di amebe, ma non pure nel senso batteriologico, in quanto che le amebe si mostrarono finora inseparabili da varie specie di batteri che sono il loro nutrimento essenziale.

Per tale scopo colturale il fuco si prepara come l'agar-agar, si neutralizza, vi si aggiunge cloruro di sodio 0.75 per cento e occorrendo anche peptone all'1 per cento: s'ottiene così una poltiglia gelatinosa, sulla quale si coltivano benissimo per successive generazioni le amebe, specialmente saprofitiche. Filtrandola a caldo si ha una gelatina molle e trasparente.

Secondo Novy e Mac Neal in agar misto a sangue fresco o, meglio, nell'acqua di condensazione che si raccoglie al fondo delle rispettive provette, si possono, per varie generazioni, coltivare *in vitro* alcuni tripanosomi. Per ciò quando l'agar, dopo essere stato disciolto, si va raffreddando verso 50° C., si aggiunge 2-3 volte il suo volume di sangue fresco, raccolto asetticamente e defibrinato, e poi si lascia solidificare a becco di flauto. Per impedire che si evapori l'acqua di condensazione bisogna chiudere le provette ermeticamente con ovatta non idrofila o mediante cappucci di cautchou. Il terreno di Novy e Mac Neal è stato modificato da vari autori, e tra gli altri da Nicolle per la coltivazione dei parassiti del Kala-azar.

I terreni di coltura così preparati si tengono, prima di usarli, entro il termostato, per escludere quelli eventualmente inquinati con batteri.

b) Si possono innestare alcuni protozoi in sacchetti di collodion contenenti siero di alcune specie animali, e innestare tali sacchetti, così preparati, nel peritoneo, per es. del coniglio; esaminando, dopo un certo tempo, il contenuto dei sacchetti, si può scorgere che in essi ha avuto luogo una vera coltivazione dei protozoi seminativi.

c) *Su terreni viventi:*

1° *Cornea.* — Il Guarnieri ha scelto questo terreno di coltura pel pus vaccinico e vaiuoloso: si può assistere così ad alterazioni patologiche che si osservano ad occhio nudo, e con tagli microscopici si possono seguire le alterazioni endocellulari.

2° *Peritoneo.* — Furono usate, per osservare lo sviluppo dei tripanosomi, le inoculazioni di sangue nel peritoneo di animali suscettibili o no all'infezione. Si possono così ora per ora, giorno per giorno, seguire alcune fasi di sviluppo.

3° *Canale digerente di animali succhiatori.* — Per seguire lo sviluppo degli emosporidi si è fatto succhiare il sangue a sanguisughe: i globuli e i parassiti si conservano a lungo; ma ulteriori fasi di sviluppo non si osservano che negli insetti capaci di funzionare da ospiti intermedi o definitivi.

Inoculazioni.

Il più spesso si procede per la via sottocutanea, endoperitoneale ed endovenosa. In tal modo può studiarsi lo sviluppo e l'azione patogena degli ematozoari, come tripanosomi ed emosporidi, inoculando cioè il sangue infetto ad animale suscettibile, per es. il sangue malarico da uomo a uomo; ciò che può farsi, essendo la malaria una malattia che prontamente si diagnostica con l'esame del sangue e prontamente si guarisce col rimedio specifico. Non essendo la malaria dell'uomo inoculabile ad altri animali, una buona parte del problema sperimentale della malaria si dovette per necessità risolvere mediante inoculazioni di sangue da uomo a uomo. Similmente dicasi per la febbre gialla, ad onta non sia curabile.

PARTE SPECIALE.

Il tipo dei protozoi si suddivide in 2 sottotipi: cigliofori e plasmodromi, i primi cioè che si muovono con le ciglia, i secondi con pseudopodi o flagelli.

La classe dei Cigliati che appartiene al sottotipi *Ciliophora* non contiene protozoi veramente patogeni, ma invece ecto- od entocommensali.

Ricorderò il solo *Balantidium coli* (fig. 410).

Questo d'ordinario alberga nel porco, dal quale sembra possa essere contagiato l'uomo. Si trova in ammalati che hanno sofferto altre malattie intestinali, e continuano ad avere catarro intestinale più o meno intenso, con alternative di peggioramenti e miglioramenti, e con ulcerazioni del crasso, del cieco e del retto, nelle quali all'autopsia si trovano i balantidi, penetrati anche nella sottomucosa, e moltiplicatisi certe volte in tal numero che si crede possano, irritando, mantenere le ulceri aperte e provocare anche emorragie. Però i medesimi effetti patologici possono aversi con ulcerazioni intestinali anche senza questo protozoo.

La fig. 410 in alto mostra, da sinistra a destra, lo stadio adulto in movimento, due forme in scissione, e altre due nella fase di accoppiamento; in basso mostra la fase cistica, nella quale esce dall'intestino insieme alle feci.

Le cisti sono grandi in media μ 60 × 32-35 per quanto si trovino anche quelle grandi μ 80 × 50; esse hanno una forma ora tondeggiante, ora ovoidale, con un polo più acuminato dell'altro; la parete cistica è a doppio contorno, regolarissima; il contenuto è grossolanamente granuloso, e occupa tutta la cisti, salvo in un punto che rammenta il peristoma dei balantidi liberi (Casagrandi e Barbagallo).



Fig. 410. — *Balantidium coli.*

Molto più interessanti dei cigliati sono per noi i plasmodromi. Questi furono suddivisi in 3 classi: rizopodi, che si muovono con pseudopodi radiciformi; sporozoi, che si riproducono per mezzo di corpuscoli sporiformi; mastigofori, che si muovono con flagelli.

Nell'attuale stato della protozoologia non è permesso di seguire, alla lettera, alcuna classificazione, che, d'altronde, per lo scopo limitato e pratico di questo Manuale non è necessaria.

Studieremo perciò l'uno dopo l'altro i protozoi patogeni che più ci interessano, cominciando dai più semplici, specialmente per ciò che riguarda il loro ciclo di sviluppo.

Rizopodi.

Amebe.

Hanno per molto tempo occupato e occupano ancora l'attenzione dei naturalisti e dei medici. Non è ancora certo se siano esseri a sè, o invece rappresentino uno stadio nella vita di altri protozoi, e, in ispecie, dei mixomiceti.

Sono corpi unicellulari che nel primo periodo della loro vita mancano di membrana, hanno protoplasma in parte granuloso, in parte jalino, e uno o più nuclei; sono dotati di un movimento a pseudopodi, che appunto da loro è stato detto ameboide.

Con opportune colorazioni, durante lo stadio ameboide, si distingue la

zona nucleare, un reticolo di granulazioni protoplasmatiche, la sostanza jalina, e spesso un vacuolo.

Nella fase cistica si distingue la membrana, il contenuto con granulazioni protoplasmatiche e il nucleo.

Nelle colture al fuco crispo (v. pag. 1159) si possono facilmente seguire le varie fasi di sviluppo, cioè la fase ameboide, di riposo, cistica, e di riproduzione.

Di quest'ultima conosciamo bene finora quella asessuale (fig. 411). Cioè un'ameba si divide in due, ciascuna di queste in altre due, e così via (fig. 411, 1-3). Una tale divisione può esser diretta od anche mitotica.

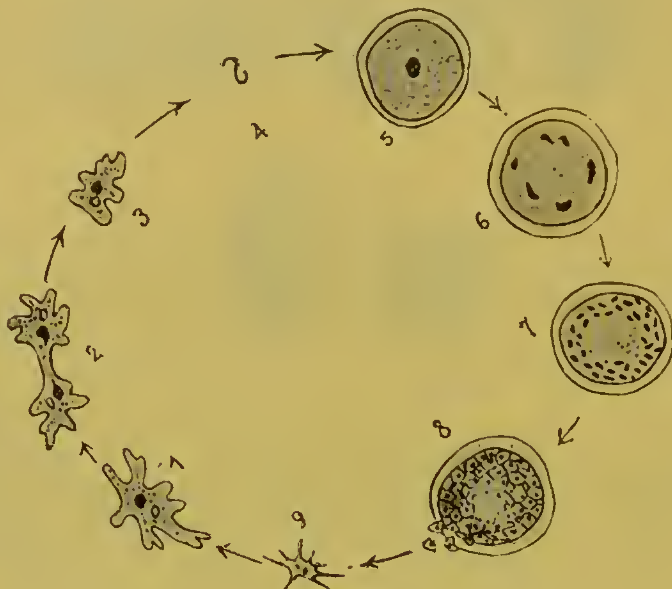


Fig. 411. — Ciclo asessuale delle amebe.

Oltre a questa riproduzione scissipara, ve ne ha un'altra per corpuscoli sporiformi (fig. 411, 5-9), che sembra sia preceduta dalla coniugazione.

Non è accertato ancora se la coniugazione avvenga per isogamia o per eterogamia, cioè fra macro- e microgameti.

Ad ogni modo, si vedono delle amebe trasformarsi in cisti con una più o meno spessa membrana; la sostanza nucleare si frammenta in più nuclei, la cisti si riempie di tante piccole spore quanti sono i giovani nuclei; e appena le nuove generazioni di amebe sono mature, la cisti si rompe e le giovani amebe escono, libere, per ricominciare un nuovo ciclo di sviluppo.

Venne descritta anche una fase di sviluppo con due o più flagelli (mastigoamebe), che ricorda i mastigofori.

Le amebe in vita saprozoica sono assai diffuse in tutto l'ambiente, per es. nelle acque ordinarie e termali, nel terreno, anche a diverse altitudini, e in generale in località umide.

Con le colture nel suddetto fuco crispo ho potuto coltivare e isolare le seguenti specie, viventi saprozoicamente:

Amoeba guttula (fig. 412, 1-8);
» *lobosa* (fig. 412, 9-15);
» *undulans* (fig. 412, 16-23);

Amoeba coli o *colisimilis* (fig. 412, $^{24-32}$);
» *spinosa* (fig. 412, $^{33-40}$);
» *diaphana* (fig. 413, $^{41-48}$);
» *vermicularis* (fig. 413, $^{49-55}$);
» *reticularis* (fig. 413, $^{56-59}$);
» *arborescens* (fig. 413, $^{60-67}$).

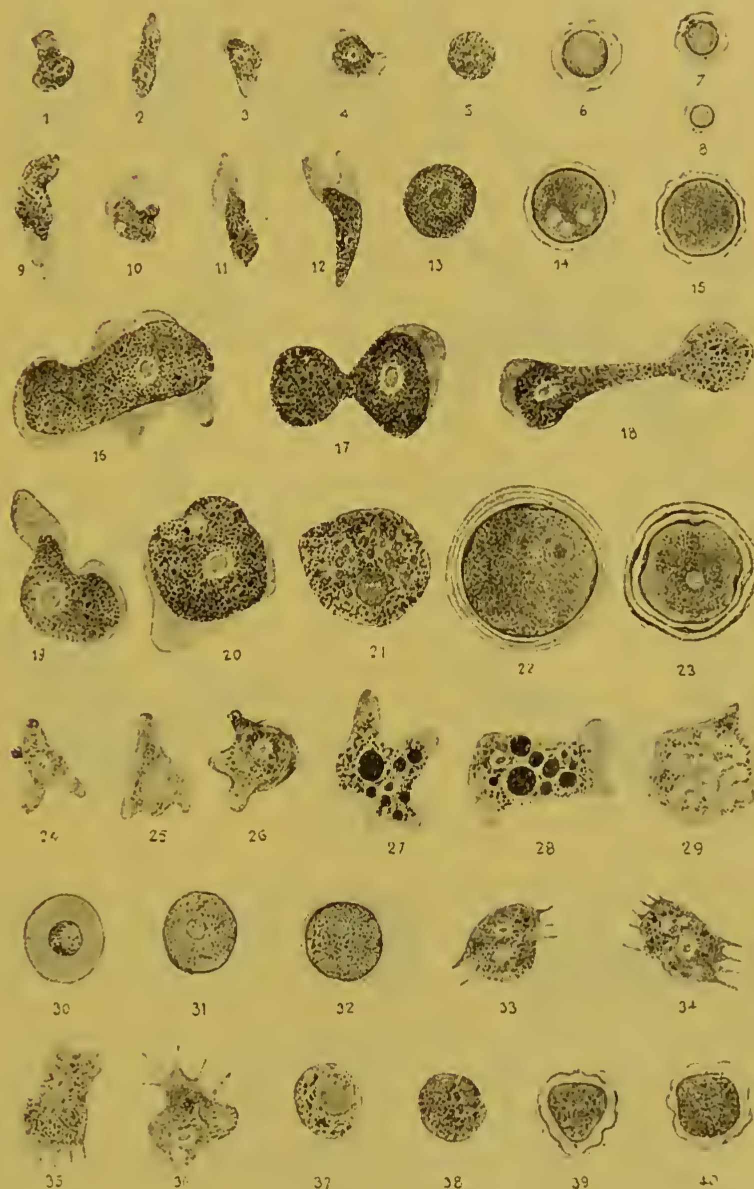


Fig. 412. — Varii tipi di amebe.

Di ognuna si vede l'ecto- ed entoplasma e talvolta il nucleo anche a fresco; si vedono poi le varie fasi, ameboide, rotonda o di riposo e cistica. Talora si vedono anche vacuoli digestivi e contrattili. La diagnosi differenziale non è difficile se si tien conto della morfologia, nelle diverse fasi di sviluppo, specie in quella ameboide e cistica.

Nelle due varie fasi, ameboide e cistica, è pure varia la ***resistenza delle amebe agli agenti fisico-chimici.***

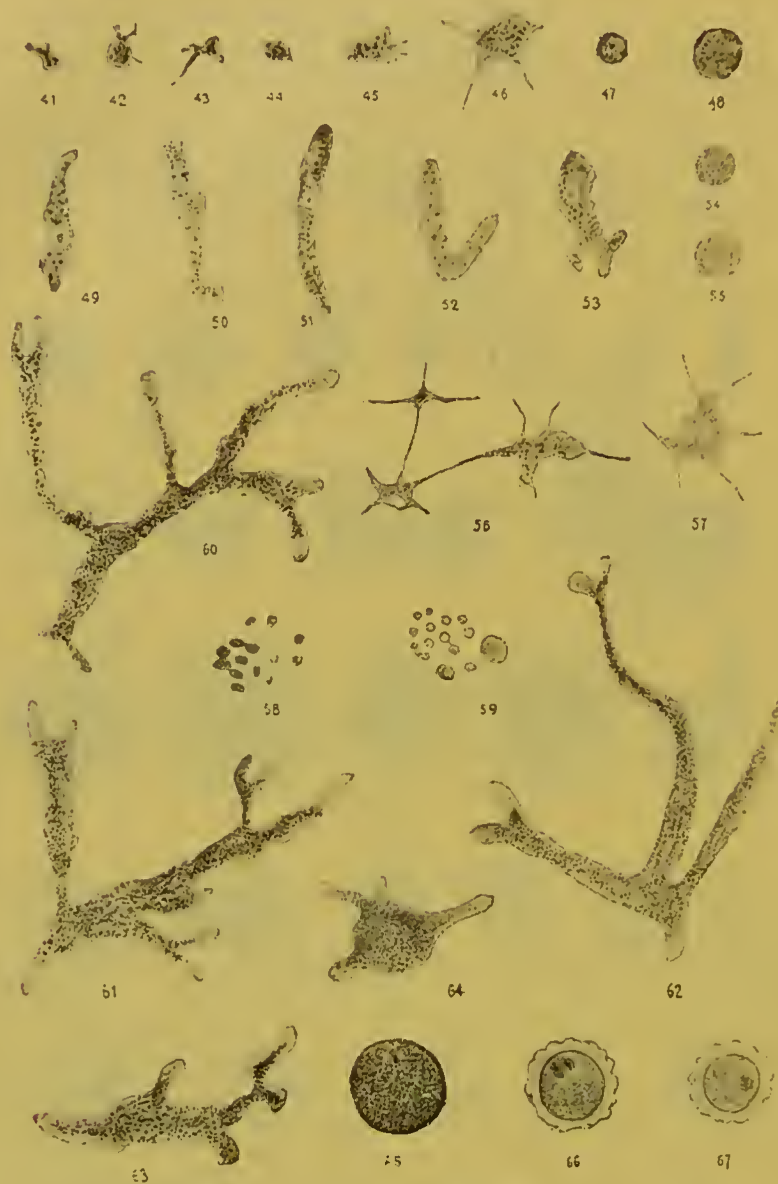


Fig. 413. — Varii tipi di amebe.

TAB. 100.

	Fase ameboide	Fase cistica
Temperatura	45° per 5 ore	60° per 1 ora
»	50° per 1 ora	67° »
Luce	..	270 ore
Disseccamento	..	11-15 mesi
Putrefazione	23 giorni	53 giorni

Azione patogena delle amebe. — Questi protozoi si trovano spesso dentro il nostro organismo: ne furono trovati nel laringe, nella bocca, nell'apparato

uro-genitale; ma il loro luogo di predilezione è il canale digerente, in ispecie l'intestino, ove trovano un ambiente alcalino, il più adatto per essi. Con mie ricerche colturali trovai la seguente *distribuzione delle amebe dell'intestino*:

TAB. 101.

Intestino di bambini	Reperto colturale positivo	Reperto colturale negativo
Bambini sani	2	12
Catarro intestinale	20	30
Diarrea verde	3	2
Diarrea sanguinolenta	0	6
Enterite follicolare	1	2
	26	52

Intestino di adulti	Reperto colturale positivo	Reperto colturale negativo
Individui sani	1	17
Catarro intestinale	0	4
Tubercolosi intestinale	0	5
Diabete	0	1
Tifoide	0	2
Colera nostrale	0	1
Colera asiatico	0	14
Proctite catarrale	0	1
Dissenteria	11	54
	12	99

Si vede quindi, come le amebe siano più frequenti nell'intestino dei bambini anzichè in quello degli adulti, nel quale un po' più frequentemente, ma non sempre, si trovano eziandio con le colture nei casi della dissenteria.

In quest'ultima infezione anche il reperto microscopico delle amebe del coli è tutt'altro che costante: in 54 casi l'ho trovato 23 volte soltanto.

Manca quindi la prima condizione essenziale per riconoscere questo protozoo come la causa unica della dissenteria. L'ameba coli è stata rinvenuta anche nelle deiezioni di persone sane; se n'è distinta perciò una varietà patogena e una non patogena. Lo Schaudinn anzi ritenne si tratti non solo di due varietà, ma addirittura di due specie differenti; la prima vivrebbe, come semplice commensale, nell'intestino sano o malato (*Amoeba s. entamoeba coli*), la seconda sarebbe capace di distruggere i tessuti della mucosa intestinale e sarebbe la causa della dissenteria tropicale (*Entamoeba histolytica*).

Le caratteristiche differenziali sarebbero le seguenti:

Entamoeba coli: ectoplasma jalino, poco rifrangente e scarso: entoplasma poco differenziabile, grosso nucleo vescicolare molto netto; abbondante cro-

matina; vacuoli; stadio duraturo cistico (fig. 412, 24-32): le cisti sono rotonde, o, meno frequentemente, ovoidali, di grandezza variabile intorno a una media di 15-20 μ, con parete a doppio contorno, e un contenuto protoplasmatico granuloso, mono- o polinucleare (8 nuclei).

Entamoeba histolytica: ectoplasma jalino (fig. 414) molto rifrangente; ben netta la distinzione fra ecto- ed entoplasma; pseudopodo capace di penetrare fra le cellule della mucosa intestinale; nucleo eccentrico poco rifrangente, spesso invisibile a fresco, e visibile con la colorazione come un pic-

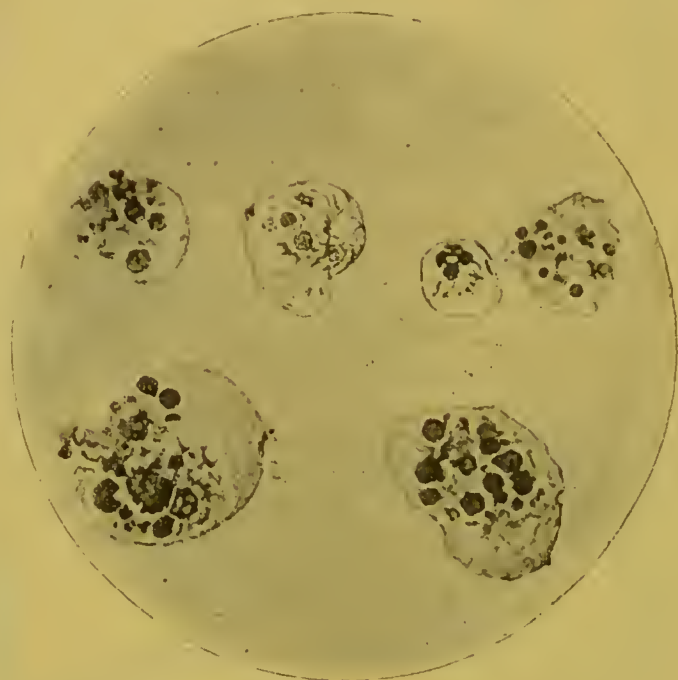


Fig. 414. — *Entamoeba histolytica.*

colo corpuscolo; poca cromatina; stadio duraturo non cistico, ma in forma di piccoli corpi sporiformi che, divenuti liberi, generano le nuove giovani amebe libere.

La prima ameba si riprodurrebbe per scissione o per schizogonia, con formazione di 8 giovani amebe, e forse anche in seguito a copulazione; la seconda si riprodurrebbe per scissione e gemmazione: entrambe si rinvengono nelle deiezioni dissenteriche, ove si trovano in ambiente adatto per nutrirsi e moltiplicarsi; e in vero si nutrono a spese dei globuli rossi del sangue delle feci: se ne vedono così di quelle che ne hanno inglobato perfino 8-10.

La fig. 414 ci mostra in feci dissenteriche l'ameba istolitica, nelle sue fasi ameboidi e di riposo.

Altre specie di ameba potrebbero esser causa delle forme dissenteriche: così sono state descritte in casi di dissenteria tropicale la *Entamoeba tetragena* e la *Entamoeba minuta*.

S'è detto, ed è vero, che inoculando nei giovani gatti le deiezioni dissenteriche, si può riprodurre la dissenteria con le amebe; ma nelle deiezioni inoculate, oltre le amebe, vi è una quantità di batteri eventualmente patogeni; e colture di amebe, prive di batteri, finora non fu possibile ottenerle.

Quindi l'esperimento negli animali non è probativo come quando si fa con le colture pure di un dato germe.

In alcuni casi di dissenteria amebica fu negativa la ricerca del bacillo dissenterico: bisognerebbe però poter escludere anche la presenza d'ogni altro bacillo paradissenterico.

Si è detto eziandio che coi suoi vivaci pseudopodi l'entoameba istolitica penetrerebbe fra le cellule della parete intestinale e così le distruggerebbe: ma nessuno ha potuto escludere che anche i batteri e i loro prodotti tossici non possano fare altrettanto.

Si è riprodotta la dissenteria nei gattini inoculando anche il pus di ascesso epatico postdissenterico contenente amebe, e sterile su colture in agar Ma il pus certe volte è sterile in alcuni terreni di coltura e in altri no; e nessuno può sostenere che il pus sia un semplice sustrato di coltura delle amebe e non invece un prodotto per sè patogeno.

Non abbiamo quindi finora esperienze decisive in favore della eziologia amebica della dissenteria, la quale del resto ormai sappiamo essere prodotta anche da batteri (v. *Batteriologia*).

Alcuni però ritengono ancora che almeno la dissenteria tropicale sia prodotta da amebe; ma in Egitto, nel Giappone, a Cuba, a Ceylon, ecc., si sono trovati come in Europa i bacilli dissenterici.

Si è voluto anche distinguere, mediante l'anatomia patologica, una dissenteria comune ed ulcerosa da batteri, ed una dissenteria tropicale o difteroide da amebe; ma nessuno può finora disconoscere che quest'ultima non possa essere prodotta anche da batteri; e ad ogni modo, per escludere la presenza e la patogenità di questi, occorrono nuove e precise osservazioni.

Altri sostengono che le amebe siano il veicolo dei batteri, mentre invece è più probabile esercitino su di essi un'azione fagocitaria; ed altri infine ammettono che le amebe tengano aperte le ulceri dissenteriche, mentre i piogeni, gli stessi bacilli coli e dissenterici, anche coi loro prodotti tossici, possono già essere più che sufficienti per esercitare e mantenere quest'azione ulcerativa.

C'è infine chi sostiene che tutte le amebe possano diventare patogene producendo un'infezione (amebiasi) che si localizza nell'intestino con la dissenteria, e qualche volta anche nel fegato, con gli ascessi. Resta però sempre la obbiezione che senza simbiosi coi batteri non si ottennero, finora, colture di amebe.

***

Prowazek ha descritto nei denti cariati una nuova specie di ameba, la *Entamoeba buccalis*, che dall'entoameba del colon si differenzia perchè ha una distinzione ben netta fra ento- ed ectoplasma, poca cromatina e si moltiplica per semplice divisione. È dubbio se sia identica o no ad alcuna di quelle anteriormente descritte in ascessi della bocca e del mascellare infeferiore.

***

Anche ad altri esseri ameboidi si è attribuito potere patogeno. Fu indicata, senza però dimostrarlo, come causa del cancro un'ameba. Ed anche nel sangue dei morbillosi, e nei casi di leucemia e pseudoleucemia si sono indicate delle amebe. La causa però di queste malattie ancora non è chiara.

Coccidi.

Sono protozoi rotondeggianti, con protoplasma granuloso, non differenziabile in ecto- ed entoplasma, con nucleo vescicolare, con nucleolo o cariosoma, senza vacuoli contrattili, senza granulazioni nutritive di



Fig. 415. — Ciclo di sviluppo dei coccidi (da Doflein).

riserva, giacchè vivendo nell'interno di cellule si nutrono per osmosi a spese di queste.

Si riproducono asessualmente e sessualmente, mediante un dimorfismo evolutivo, scoperto da R. Pfeiffer e completato poi da Schaudinn, Simond, Siedlecki ed altri. Cioè in questo gruppo di esseri si succedono,

nella loro evoluzione, 2 cicli, uno endogeno in un primo ospite, con moltiplicazione di germi, che producono l'autoinfezione; l'altro, ch'è preceduto da fenomeni sessuali, genera individui incistati, resistenti, e capaci di abbandonare il 1° ospite, per trasportare in un 2° l'infezione.

Di questi cicli di sviluppo dei coccidi abbiamo, secondo Schaudinn, 2 tipi. Nel 1° tipo (fig. 415) si vede in I il nuovo germe libero, in II mentre penetra in una cellula epiteliale, in cui il nucleo si sposta alla periferia mentre il protozoo si sviluppa e cresce (III e IV); in V si inizia, con la proliferazione del nucleo, la moltiplicazione asessuale, che continua e si compie nelle fig. VI e VII, in forma di rosetta: uno dei corpicciuoli figli (VIII) ricomincia l'autoinfezione penetrando in nuove cellule sane dello stesso ospite; altri 2 corpicciuoli figli (X, XI) si differenziano sessualmente in 2 serie di corpi gli uni femminili (XI *a*, *b*, *c*), gli altri maschili (XII *a*, *b*, *c*, *d*); la fig. XI *c* è la cellula-uovo che sta avviandosi al suo completo sviluppo; la fig. XII *d* è la cellula maschile piena di spermatozoi; uno di questi si vede libero nella fig. XII *e*.

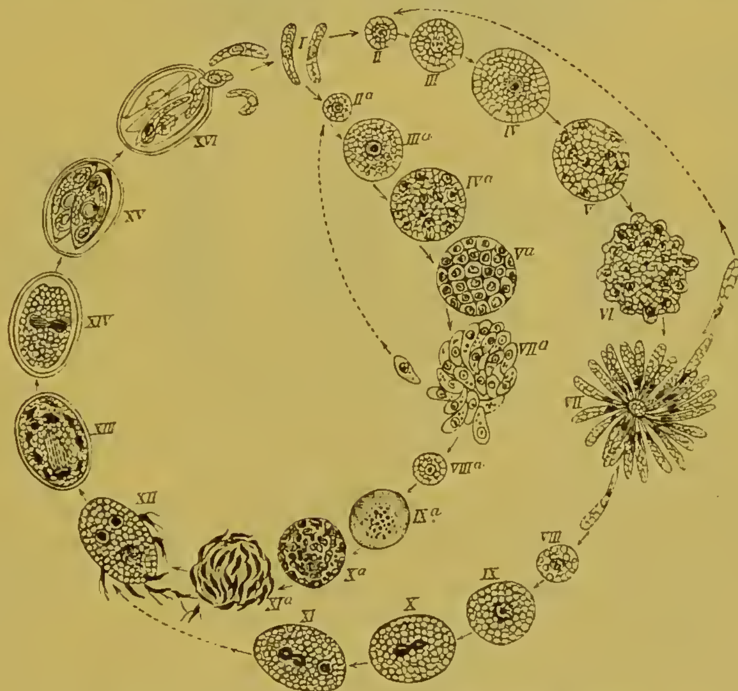


Fig. 416. — Ciclo di sviluppo dei coccidi (da Schaudinn).

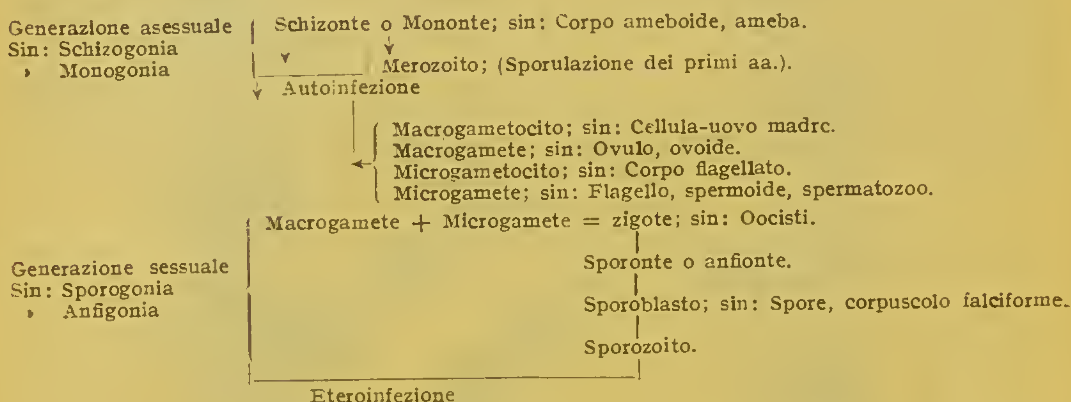
La fig. XIII mostra la fecondazione; vari spermatozoi si dispongono attorno alla cellula-uovo per fecondarla: uno solo però entra, e appena entrato, la cellula femminile si ricuopre di una membrana. Successivamente si ha la proliferazione nucleare (XV-XVIII) e la formazione di tanti corpuscoli anticamente detti falciformi (XIX), i quali, rompendosi la cisti, si fanno liberi (XX) e uno di essi ricomincia nel nuovo ospite un'altra infezione endocellulare.

Nel 2° tipo (fig. 416) il ciclo asessuale è duplice, si ha cioè una serie di elementi maschili (I-VII *a*), che arrivando a moltiplicarsi riproducono

nello stesso ospite la rispettiva infezione; così fanno, per loro verso, gli elementi femminili (I-VII). I corpicciuoli figli, della riproduzione asessuale, rispettivamente maschili (VIII*a*-XI*a*) e femminili (VII-XI), diventano sempre più sessualmente differenziati, per arrivare poi alla fecondazione (XII) e poi alla proliferazione nucleare e alla definitiva produzione di corpuscoli falciformi o sporozoiti (XIII-XVI).

Siccome i vari autori per indicare le diverse fasi adottano nomi differenti, così è anche utile rappresentare come in uno specchio (tab. 102) e coi diversi sinonimi i vari passaggi del ciclo evolutivo completo dei coccidi.

Tabella 102.



La *coccidiosi* è una infezione cellulare legata allo schizo- o monogonia, ed alla successiva invasione nelle cellule epiteliali delle vie aeree (naso, laringe, trachea, polmone), delle vie digerenti (bocca, stomaco e specialmente intestino), delle vie biliari, del rene e del testicolo; raramente n'è invasa la milza, e non ne sono mai invasi gli organi sessuali femminili.

Negli animali inferiori può esservi una infezione anche dei tessuti in quanto che i coccidi invadono la pelle, il tessuto connettivo muscolare e il mesenterio: questi sporozoi non sono dunque sempre e obbligatoriamente parassiti endocellulari; sono, comunque, assai diffusi; si incontrano cioè nei vermi, miriapodi, insetti, molluschi, pesci, anfibi, rettili, uccelli, mammiferi, e anche nell'uomo. Sono gli sporozoi più frequenti negli uccelli e nei mammiferi, e in ispecie fra gli erbivori. Fra i *coccidi patogeni* a noi interessa di più il seguente:

Coccidium oviforme (sin. *cuniculi, perforans*).

La fig. 417 dimostra il ciclo di sviluppo di questo coccidio: le prime quattro figure in alto mostrano il ciclo asessuale che termina con la monogonia: le due figure di mezzo mostrano il macrogamete e il microgamatocito: le sei figure in basso, mostrano alcuni stadi del ciclo sessuale: avvenuta cioè la fecondazione, si ha la ovocisti e poi la formazione di sporo-

blasti, e infine la formazione di spore che generano gli sporozoiti, i quali ricominciano la nuova infezione.

Il coccidio oviforme è stato trovato finora nell'uomo, in cui fu dal Rivolta chiamato *Coccidium hominis*, e nei bovini affetti da dissenteria rossa o emorragica, oltrechè nei conigli.

Nell'uomo è stato anche descritto da Gubler in un caso di tumori pseudocancerigni del fegato: i tumori erano ripieni di un liquido in cui nuotavano corpuscoli ovoidi, riconosciuti poi da Leukart come coccidi oviformi. Nel rene ed uretere dell'uomo da Baillet e Lucet, nell'essudato pleurico da Künster e Petres sono stati pure indicati dei coccidi, non però ben definiti, nè certamente tali.



Fig. 417. — *Coccidium oviforme* (da Rivolta e Siedlecki).

Nel *coniglio* è notissima e comune l'infezione coccidica del fegato e dell'intestino.

Emosporidî.

Sono parassiti degli elementi figurati del sangue e per la maggior parte, anzi, del globulo rosso nelle varie classi di animali, dai batraci ai rettili, agli uccelli, ai mammiferi e all'uomo.

Nelle forme più giovani sono cellule con protoplasma dotato di movimento ameboide, con nucleo e con abbondante cromatina, in forma di granuli o aghi sparsi o raccolti insieme. Ben presto alcuni di quelli che invadono i globuli rossi acquistano granuli di pigmento scuro e nero (melanina) ch'è il residuo della digestione della emoglobina; talvolta possiedono anche vacuoli non contrattili.

La questione se gli emosporidî stiano dentro o semplicemente attaccati al globulo rosso è oziosa, dal momento che, comunque, vivono e si sviluppano a spese di esso.

Hanno generazione alternante. Cioè, nel 1° stadio della loro vita in animali superiori (monogonia o schizogonia) sono parassiti del globulo rosso dei vertebrati; nel 2° stadio (anfigonia o sporogonia) sono invece parassiti di alcuni insetti.

Queste due fasi di sviluppo costituiscono insieme il ciclo completo di

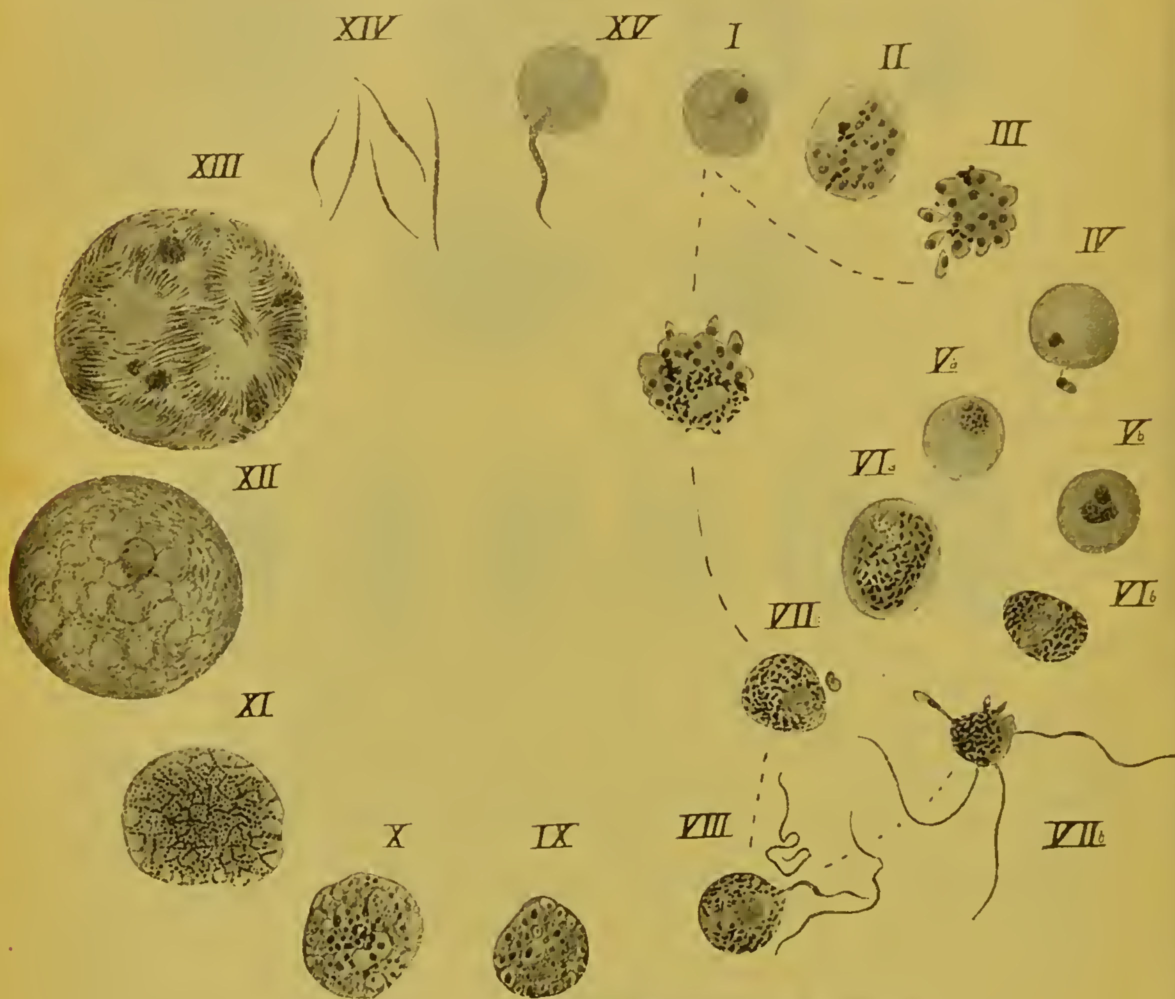


Fig. 418. — Ciclo di sviluppo dell'emosporidio della terzana lieve..

riproduzione degli emosporidî: la 1ª fase corrisponde all'infezione del sangue del 1° ospite, la 2ª fase corrisponde all'infezione del 2° ospite, delle zanzare cioè o delle zecche.

Seguiamo questo ciclo completo (fig. 418), prendendo come tipo quello della febbre terzana lieve, ch'è il meglio conosciuto.

In I si vede un globulo rosso, che contiene un giovane parassita ameboide, col suo nucleo vescicolare e con il cariosoma. In II si ha lo stesso parassita che crescendo ha invaso buona parte del globulo rosso: ha i granuli di melanina: e per una proliferazione del nucleo e della

PLASMODI DELLA MALARIA NELLE ZANZARE

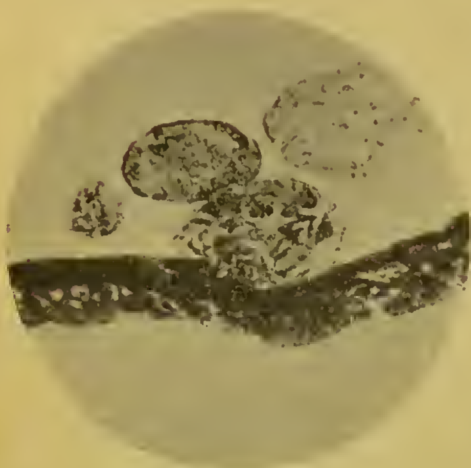


Fig. 1.



Fig. 2.

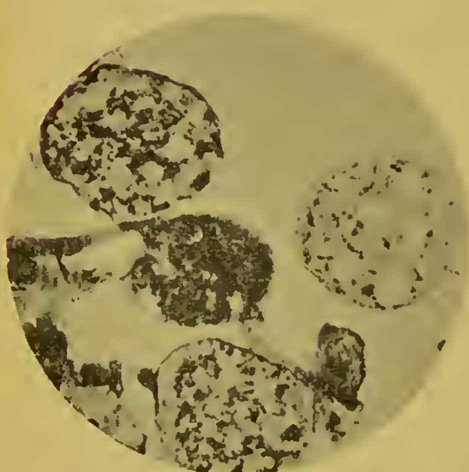


Fig. 3.

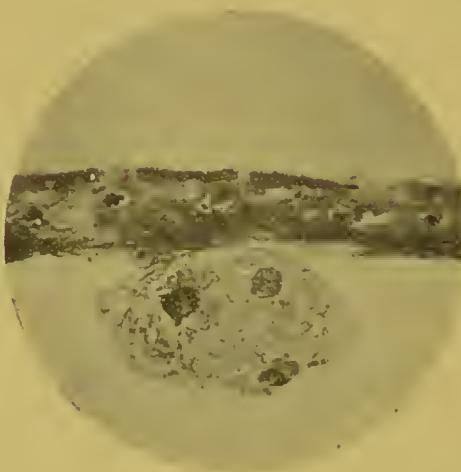


Fig. 4.

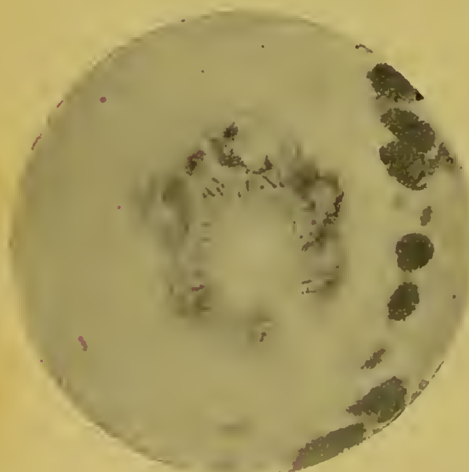


Fig. 5.



Fig. 6.

Unione Tip.-Editrice Torinese.

cromatina è avviato verso la scissione o riproduzione monogonica. Questa è completa in III. Le spore, o merozoiti, libere nel plasma, invadono un globulo rosso sano e quivi possono seguire due vie: o ricominciare il ciclo asessuale e così via via per tante generazioni successive, e quindi per tanti successivi accessi febbrili ; ovvero possono già sessualmente differenziarsi (IV) ed iniziare la produzione di due serie di gameti, i femminili e i maschili; in V^a, VI^a, vedesi lo sviluppo progressivo dei macrogameti o gameti femminili; in V^b, VI^b, si vede lo sviluppo dei microgametociti o dei gameti maschili, in VII^a si vede la maturazione del macrogametocito, in VII^b la produzione dei microgameti o flagelli o spermatozoi. Uno di questi (VIII) penetra nella cellula-uovo o macrogamete, e la feconda.

Da qui in avanti lo sviluppo ulteriore o sessuale non può avvenire che nello stomaco delle zanzare; dove le figure IX, X, XI, XII, XIII e le fig. 1-5 della Tav. II rappresentano l'evoluzione degli sporonti o anfionti, la formazione cioè di cisti, il contenuto delle quali, per una divisione e proliferazione nucleare diretta, conduce sino alla formazione di un ammasso di sporozoiti (XIII), che, rotta la parete cistica, diventano liberi (XIV e Tav. II fig. 6), vanno nelle glandole salivari, e con la saliva, mediante la puntura della zanzara, penetrano di nuovo nel sangue, dove invadono (XV) globuli rossi sani, e riprincipiano l'infezione.

Quel che avviene di questi sporozoiti durante il periodo di incubazione delle febbre non lo sappiamo ancora. Si riproducono senz'altro, ovvero iniziano subito lo sviluppo monogonico, producendo man mano generazioni di parassiti asessuali, che solo se arrivati a un certo numero determinano la febbre ?

Gli accessi febbrili sono certamente legati ad ogni nuova generazione monogonica: s'inizia la febbre con la invasione dei nuovi mononti nei globuli rossi, e cessa quando tutti i parassiti giovani, divenuti endoglobulari, cominciano nel globulo rosso il loro ciclo di sviluppo asessuale: la durata di questo ciclo di sviluppo coincide col diverso periodo febbrile, quartanario o terzanario.

La febbre può mancare così nella infezione latente, come anche quando la malattia volge alla guarigione spontanea, e così pure in alcune infezioni gravissime con sintomi perniciosi.

Le recidive a lunghi intervalli son dovute certamente a forme che rimangono latenti. Queste recidive sono così caratteristiche, che la febbre malarica si potrebbe chiamare febbre recidivante per analogia con la cosidetta febbre ricorrente prodotta dalle spirochete. Secondo Schaudinn e altri AA. i gameti femminili che preparano il ciclo sessuale sarebbero capaci anche di moltiplicarsi per un processo di partenogenesi (fig. 418 fra VII^a e I) producendo giovani elementi che penetrerebbero come quelli della generazione monogonica o asessuale dentro nuovi globuli rossi, per produrre così la febbre recidiva.

Le alterazioni che i parassiti possono indurre nelle emazie sono:

rigonfiamento e consecutivo scoloramento totale, ovvero scoloramento parziale, con la raccolta cioè dell'emoglobina verso il parassita; raggrinzamento e consecutivo colore più intenso dei globuli; necrosi e raggrinzamento, con produzione dei cosidetti globuli rossi ottonati, cioè del colore dell'ottone vecchio; frammentazione dei globuli parassitiferi;

comparsa di granulazioni, colorabili coi colori neutri di anilina;

trasformazione dell'emoglobina in melanina, onde la melanemia ch'è propria esclusivamente dell'infezione malarica ed è legata alla nutrizione degli emosporidî, cioè rappresenta il residuo indigesto della loro digestione; ovvero produzione di un pigmento ocraceo (emosiderina) che dà la reazione del ferro; quindi il disfacimento delle emazie avviene per un duplice meccanismo, che conduce cioè alla produzione della melanina da una parte, della emosiderina dall'altra;

dissoluzione e passaggio dell'emoglobina nel siero del sangue.

Agglutinine, precipitine, tossine specifiche degli emosporidî non furono ancora con certezza dimostrate. Le emolisine sono ancora allo studio.

Il meccanismo perciò della distruzione del sangue e della febbre non è conosciuto ancora intimamente.

Altrettanto dicasi del meccanismo dell'immunità, di cui conosciamo quella naturale, ch'è rarissima, e quella, meno rara, consecutiva alla malattia più o meno lungamente sofferta. La fagocitosi è un processo di grande importanza nel corso dell'infezione malarica; ma se si cerca di analizzare quale influenza eserciti sul decorso della infezione, e se possa condurre alla guarigione spontanea, non si può rispondere nulla di preciso. La fagocitosi, certamente, deterge il letto vasale da tutte le scorie dei cadaveri degli emosporidî, depositati nel sangue circolante e negli organi durante l'infezione acuta; ma ciò avviene per ogni granulazione estranea che arrivi o si formi nel sangue, o si depositi negli organi. Certo, poi, la diversa mitezza o gravezza dell'infezione si deve alla qualità e alla diversa virulenza dei parassiti.

La generazione anfigonica o sporogonica si compie, come fu detto, nello stomaco di speciali insetti.

Difatti, sotto la guida del Manson, il Ross potè per primo dimostrare che il plasmodio estivo-autunnale (semilune) dell'uomo si sviluppa entro speciali zanzare dalle ali macchiate (oggi note col nome di anofeli), mentre il proteosoma degli uccelli si sviluppa dentro altre zanzare grigie (che sappiamo oggi essere dei culex) e si trasmette con l'inoculazione della saliva in seguito alla puntura. Il lavoro fondamentale del Ross fu confermato poi da quelli di Grassi, Bastianelli, Bignami, Koch e da altri.

Come decorre l'infezione negli insetti e in specie nelle zanzare non lo sappiamo bene: pare che durante l'inverno e la primavera possa in esse avvenire una guarigione spontanea, con relativa degenerazione e scomparsa degli sporonti o anfionti; in un caso però avrebbe lo Schau-

dinn osservata la trasmissione ereditaria. Pare altresì che alcune specie e certe razze di zanzare, che vivono in alcune località di paludismo senza malaria, siano immuni dalla infezione.

EMOSPORIDÎ NELL'UOMO.

1. PLASMODIUM QUARTANAE. — La schizogonia avviene in 72 ore circa, onde il tipo febbrile quartanario, cioè ogni 3 giorni.

Essa si compie come viene indicato dalla fig. 419 (da preparati a fresco).

I mononti hanno movimento ameboide pigro (fig. 419,[1-4]) e di breve durata: i granuli di pigmento nero sono grossi e poco mobili: la grandezza massima dei parassiti è quella di una emazia normale.



Fig. 419. — Plasmodio della quartana.

I merozoiti (fig. 419,[5-7]) sono disposti a margherita attorno al nocciolo residuale di pigmento nero, sono di forma oblunga, in numero di 6-12, e con nucleo.

L'emazia che alberga il parassita non si ingrossa; talvolta anzi è impiccolita ed ha un colorito più scuro.

Quando nel sangue di un malarico si compie una sola generazione asessuale di questo plasmodio, si ha la infezione quartanaria semplice: si ha la quartana doppia quando son due le generazioni, e quando sono tre, la quartana diventa tripla, cioè pseudoquotidiana o quotidiana quartanaria.

Raramente, quando cioè le generazioni monogoniche sono più numerose, si hanno febbri irregolari e subcontinue, ma non mai perniciose. La distruzione dei globuli rossi è limitata.

Nel sangue periferico i gametociti sono rari, rarissimi i microgametociti. La fig. 419,[9] mostra un gamete femminile adulto, e la fig. 419,[10] un gamete maschile in via di emettere microgameti corti e in poco numero.

La Tav. I, da preparati colorati col metodo Giemsa (v. pag. 1157), dimostra le varie fasi del parassita della quartana nel sangue periferico dell'uomo: la fig. 1 rappresenta un merozoito libero e nelle successive figure 2-5 il parassita, penetrato nel globulo rosso, aumenta a poco a poco di volume,

incomincia ad avere nel suo corpo granuli di melanina e si avvia alla moltiplicazione asessuale: il nucleo si divide, circa dopo 48 ore dall'invasione del globulo (fig. 5-6), e dopo 60 si trovano nel sangue i parassiti, quali si dimostrano nelle fig. 7 e 8, con molti accumuli di cromatina sparsi nel protoplasma ed il pigmento più o meno ammucchiato. I nuclei di cromatina tendono a disporsi alla periferia del parassita ed il pigmento in un unico ammasso al centro: intorno a ciascun nucleo si circoscrive un po' di protoplasma e così formansi i merozoiti, come sono rappresentati nella fig. 9, che incominceranno un nuovo ciclo asessuale. La fig. 10 della stessa Tav. I mostra un gametocito femminile con nucleo unico, protoplasma granuloso, abbondante pigmento: la fig. 11 un microgametocito che si riconosce dal precedente per il nucleo molto più grande, ricco di cromatina, e per il protoplasma jalino.

La sporogonia non è ancora del tutto conosciuta.

Il periodo di incubazione è di circa 2 settimane, talvolta perfino di 47-66 giorni.

2. PLASMODIUM TERTIANAE LAEVIS, S. VIVAX. — La schizogonia avviene in 48 ore; i mononti (fig. 420,1-4) hanno vivacissimo movimento ameboide, granuli di pigmento nero fini e mobilissimi; la grandezza massima di questi parassiti può superare quella di una emazia normale.

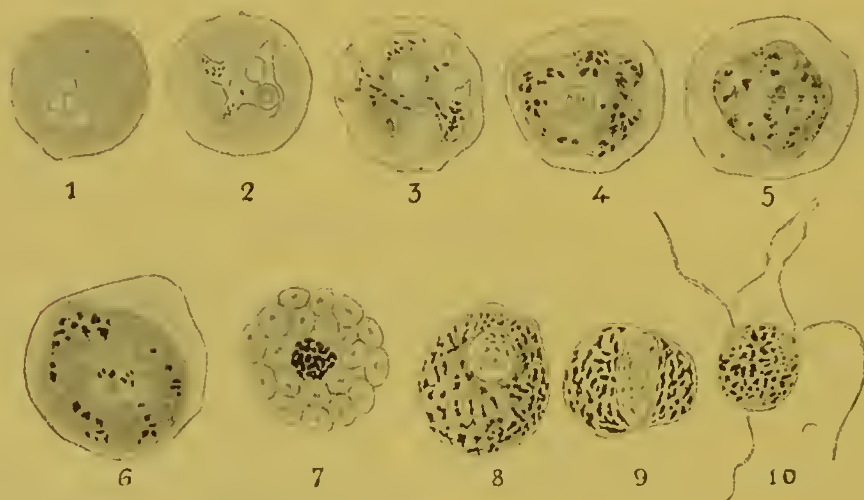


Fig. 420. — Plasmodio della terzana lieve.

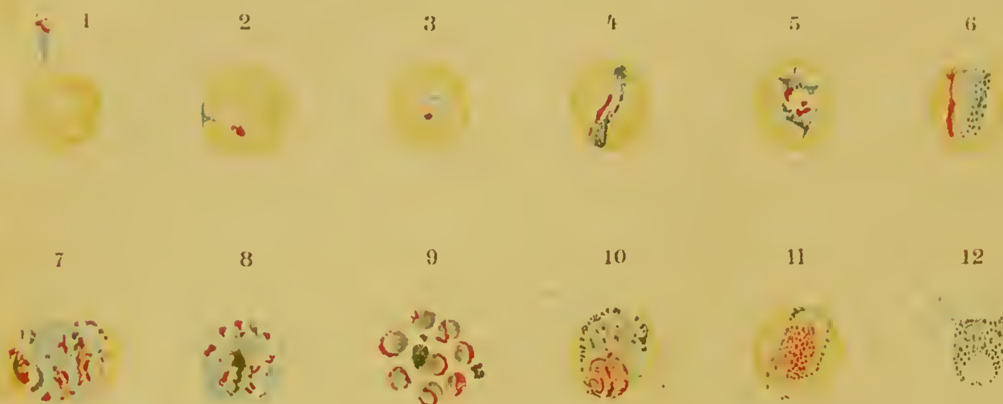
I merozoiti (fig. 420,5-7) son disposti a girasole o a grappolo, hanno figura rotonda, e arrivano al numero di 12-20.

L'emazia che alberga il parassita si rigonfia e si scolora: vi si dimostrano facilmente, con una buona colorazione, disseminate delle granulazioni neutrofile (granulazioni di Schüffner), sotto forma di una punteggiatura di tutto il globulo rosso.

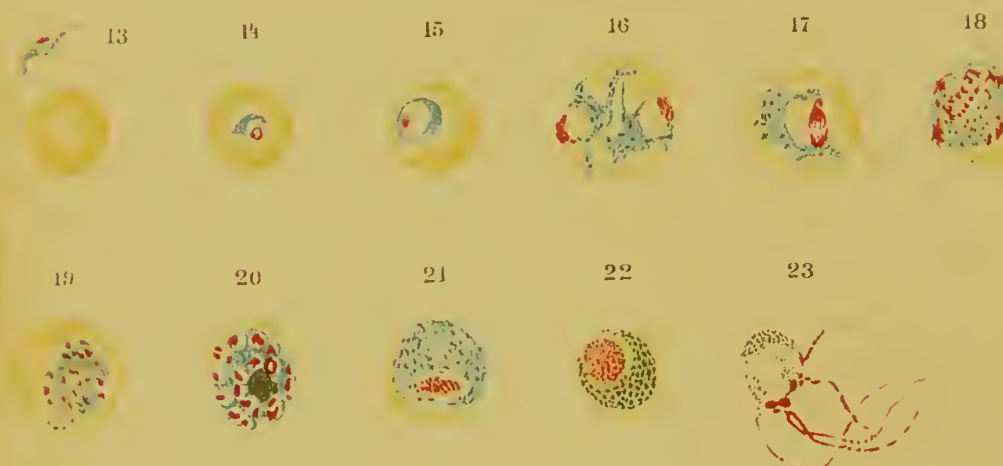
Quando nel sangue di un malarico si svolge una sola generazione asessuale di questo emosporidio, si ha la febbre terzanaria semplice, e quando le generazioni sono due la terzana diventa doppia, o quotidiana terzanaria. Rare sono le infezioni terzanarie subentranti, dovute a più generazioni parassitarie: non si ha mai la perniciosa.

PLASMODI DELLA MALARIA DEL SANGUE

Plasmodium quartanae



Plasmodium tertianae laevis



Plasmodium aestivoautumnale



Unione Tip. Editrice Torinese.

La distruzione dei globuli rossi è sempre relativamente limitata.

La Tav. I, da preparati colorati col metodo Giemsa, mostra nelle figure 13-20 il ciclo asessuale nel sangue dell'uomo: i caratteri differenziali sono: il rigonfiamento dell'emazia, sempre maggiore per quanto più aumenta di volume il parassita: i movimenti ameboidi vivaci di questo, che gli fanno assumere contorni irregolarissimi: dopo circa 30 ore incomincia la divisione del nucleo (fig. 17) che conduce a forme polinucleate quali nelle fig. 18 e 19. In 20 si vede una forma in cui è quasi compiuta la moltiplicazione asessuale: i merozoiti, in numero molto maggiore che nella quartana, sono irregolarmente disposti intorno ad un accumulo di pigmento.

Nel sangue periferico si riscontrano talvolta abbondanti gameti, e bisogna saper bene come essi possono riconoscersi.

In generale si può dire che sono gametociti quelle forme che arrivate ad un certo stadio di sviluppo non dimostrano alcuna tendenza alla divisione nucleare; ma invece in essi la cromatina, che appare per lo più sotto la forma di bastoncelli o filamenti, è tutta racchiusa come dentro un anello del plasma; ed anche quando con lo sviluppo ulteriore si sgretola in fini granulazioni continua sempre a costituire un tutto insieme.

Nello stadio adulto si possono anche a fresco (fig. 420,[8-10]) distinguere i macrogametociti.

Questi ultimi hanno la cromatina accumulata in forma di un gomitolo di fili; il protoplasma è pochissimo colorabile, ed essendo fortemente pigmentato di granuli di melanina, questi risaltano molto sul fondo quasi scolorato del parassita. I singoli microgameti, i cosidetti flagelli, sono abbondantemente provvisti di cromatina.

I macrogametociti invece hanno un solo ammasso, spesso nastriforme, di cromatina in mezzo a una zona chiara poco o punto colorata; il pigmento nero è disseminato irregolarmente per tutto il corpo protoplasmatico che appare granuloso e fortemente colorabile. Le fig. 21-22 della Tav. I rappresentano un gamete femminile ed uno maschile, questo alquanto più piccolo, con maggior quantità di cromatina e protoplasma poco granuloso. In 23 è rappresentato un microgametocito che ha emesso i microgameti, in un preparato tenuto in camera umida.

Ad ogni apiressia si forma una nuova generazione di gameti; ogni nuovo accesso febbrile ne distrugge la più gran parte.

La sporogonia avviene a 28°-30° C. in 8 giorni circa nello stomaco degli anofeli.

Il periodo d'incubazione è in media 10 giorni, eccezionalmente perfino di 3 settimane.

3. Plasmodium aestivoautumnale, s. precox. — È il parassita delle febbri gravi o estivo-autunnali o tropicali (fig. 421).

Di queste febbri si distinguono 2 tipi clinici fondamentali: quotidiana vera, terzana grave. Secondo alcuni si avrebbero analogamente 2 varietà parassitarie, le quali si distinguerebbero principalmente perchè l'una compirebbe la schizogonia in 24 ore, l'altra in 48 ore, e perchè si potrebbero rispettivamente riprodurre con la inoculazione sperimentale; secondo altri autori la quotidiana è sempre una terzana doppia, vale a dire causata da due generazioni di parassiti.

Nel sangue periferico si riscontrano le forme giovani del ciclo asessuale; quelle adulte e le forme in schizogonia, tranne che talora nelle perniciose, si riscontrano soltanto negli organi interni. Viceversa le forme sessuali si osservano nel sangue periferico soltanto adulte: gli stadî più giovanili si ritrovano soltanto negli organi interni, e specialmente nel midollo delle ossa.

I mononti giovani (fig. 421,[1-5]) hanno movimento ameboide vivace, finissimi granuli di pigmento nero; i merozoiti (fig. 421,[6-11]) sono a piccoli cumuli di corpicciuoli rotondi irregolarmente disposti in numero di 6-8-10.



Fig. 421. — Plasmodio della terzana grave.

Il globulo rosso ospite subisce di rado uno scoloramento generale; più spesso si scolora parzialmente per l'accumulo dell'emoglobina verso il parassita. Quando alberga forme sessuali può mostrare anche granulazioni neutrofile (Argutinski).

Si ha pure quell'altra caratteristica necrosi che conduce alla formazione (fig. 421,[12]) dei cosidetti globuli rossi ottonati.

È questo il solo parassita che può dare le perniciose, oltrechè le febbri continue e subcontinue gravi.

Le febbri cosidette tropicali non differiscono clinicamente dalle nostre estivo-autunnali, nè v'è differenza eziologica tra quelle e queste febbri.

La perniciosità, oltrechè da ragioni individuali (malattie pregresse o preesistenti) dipende da ragioni parassitarie, come: presenza di parassiti estivo-autunnali, abbondanza del reperto parassitario almeno in qualche organo (cervello, ecc.), maggiore attività proliferativa, alto grado di tossicità parassitaria. Questa ultima è così variabile che di parassiti estivo-autunnnli, dal punto di vista del loro potere tossico, possiamo averne una varietà attenuata, come nell'Alta Italia e in parte della Media, una varietà a virulenza esal-

tata, come nel Lazio e nell'Italia Meridionale e Insulare, e infine una varietà ipertossica o perniciosa.

La distruzione del sangue nella infezione grave può essere tale che un solo attacco di perniciosa può costare fino un milione di emazie per mmc.

Con la distruzione del sangue, e secondo alcuni con la perniciosità dei parassiti, fu messa in rapporto anche l'emoglobinuria. Questa può essere talora nei malarici causata somministrando chinino, ovvero può sorgere anche senza somministrarlo.

L'eziologia però e la patogenesi della emoglobinuria sono oscure ancora: non si sa se provenga da speciale varietà tossica di plasmodî estivo-autunnali, ovvero da un altro speciale parassita, rassomigliabile ai pirosomi o piroplasmi della emoglobinuria dei bovini (v. pag. 1182).

Oltre alle 2 suddette varietà parassitarie estivo-autunnali si osserva talora anche un *Plasmodium immaculatum*, cioè senza pigmento nero e quindi senza melanemia: di simili emosporidî apigmentati se ne vedono in altri animali; nell'uomo si trovano raramente sporulazioni asessuali senza pigmento nel cervello, mentre in altri visceri se ne trovano col blocchetto di melanina al centro. Ciò vuol dire che alcuni emosporidî estivo-autunnali della varietà perniciosa possono arrivare alla schizogonia senza prima pigmentarsi; ma se possa farsene una specie a parte, o si tratti di una varietà è ancora da vedersi.

I gametociti dei plasmodî estivo-autunnali (fig. 421,[13-22]) si riconoscono perchè fino da giovani hanno la figura allungata, che diventa poi ovoide, e poi semilunare.

Con la colorazione (Tav. I, fig. 30-32) si riconoscono, quando sono giovani, anche perchè più intensamente colorabili dei mononti.

I gametociti adulti si possono differenziare nelle due forme sessuali.

Il microgametocito ha il protoplasma jalino, il pigmento nero accumulato al centro, in forma di un largo anello pigmentato, e 10-20 granuli di cromatina, i quali debordano dallo spazio occupato dal pigmento.

Invece il macrogametocito ha protoplasma granuloso, il pigmento nero distribuito irregolarmente, e solo scarsi granuli di cromatina, di solito nascosti sotto e fra i granuli di pigmento.

Nella Tav. I, fig, 33 e 34, sono rappresentati due gameti, microgametocito il primo, macrogametocito il secondo, colorati con il metodo di Giemsa. Si scorgono subito fra la forma maschile e la femminile differenze notevoli nella grandezza del nucleo e quantità di cromatina, e nell'aspetto del protoplasma.

La sporogonia a 28°-30° C. avviene nello stomaco degli anofeli in circa 8 giorni.

Il periodo d'incubazione è in media di 3-4 giorni, talvolta al massimo 10-17 giorni.

***

Per ciò che concerne le principali note caratteristiche dei generi *Culex*, *Stegomyia* e *Anopheles* vedi in questo volume, a pag. 1117 e seguenti.

* * *

Per riconoscere le zanzare infette, preparato accuratamente lo stomaco come è indicato nella *Parassitologia*, a pag. 1135 lo si osserva a secco con l'obbietivo 8* di Koristka.

Gli anfionti e le oocisti (v. Tav. II, fig. 1-5) si trovano di regola nella parte dilatata dell'intestino medio, o stomaco propriamente detto, ma possono trovarsi anche in altre sezioni di esso.

Possono essere pochissimi (uno, due) o in numero considerevole (parecchie centinaia).

L'esame dello stomaco è bene farlo quando la zanzara ha digerito il sangue. Nei casi in cui si deve esaminare uno stomaco con sangue si procede nello stesso modo. E di più si fa una leggera pressione sul vetrino coprioggetti per schiacciare un po' lo stomaco; il sangue fuoriesce e si allontana con un po' di carta bibula, mentre da un lato si mette qualche altra goccia di soluzione fisiologica.

Ma l'esame non deve limitarsi allo stomaco: si devono preparare accuratamente anche le glandole salivari (per la tecnica vedi *Parassitologia* a pag. 1135). Se queste sono infette si veggono gli sporozoiti (Tav. II, fig. 6) fra le cellule o nel lume; e per poco che si schiacci la preparazione fuoriescono in gran parte nel liquido ambiente.

Gli sporozoiti possono vedersi isolati e riuniti in fascetti. Possono essere scarsi ovvero in numero sterminato. L'osservazione può farsi anche a secco con l'obbiettivo 8* di Koristka. Si può anche procedere alla fissazione, colorazione; oppure al taglio delle sezioni, come al solito.

* * *

Alla classe degli sporozoi appartengono anche: i MIXOSPORIDÎ, che producono malattie specialmente nei pesci; i MICROSPORIDÎ, che attaccano a preferenza gli artropodi (pebrina del baco da seta); i SARCOSPORIDÎ o psorospermi delle carni.

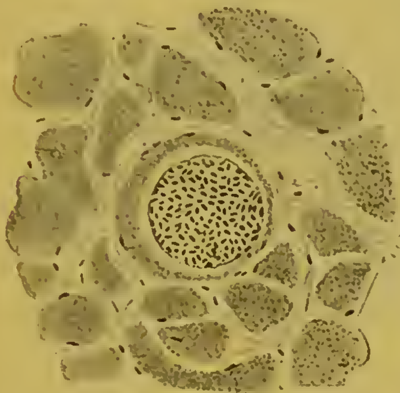
Questi ultimi sporozoi si trovano molto diffusi nei muscoli dei vertebrati, a preferenza nei mammiferi (suini, ovini, bovini).

Sono parassiti della fibrocellula muscolare, senza destare reazioni nel tessuto circostante, e senza produrre fenomeni morbosi, eccetto tutt'al più qualche paralisi o paresi muscolare. Possono raggiungere perfino la lunghezza di 2 cm.

Il loro ciclo di sviluppo è ancora poco conosciuto. Si conosce il solo stadio dei cosidetti otricoli del Miescher, che sono cisti allungate, provviste di una membrana sottile, divise all'interno, mediante setti, in molte camere piene di cosidetti pansporoblasti, o accumuli di spore, o corpuscoli reniformi, falciformi, ecc., provvisti di nucleo (v. pag. 822, fig. 189) e omologhi, forse, ai corpuscoli falciformi dei coccidi. Non sono ancora ben noti i modi d'infezione.

Lo Smith è riuscito a riprodurre, dopo un periodo di incubazione, la *Sarcocystis muris* facendo mangiare a sorci sani la carne dei sorci infetti; esperienze simili ha fatto il Negri sulle cavie. Ma per altre sarcocisti, per quelle degli erbivori, questo modo d'infezione, dalla via dello stomaco, non è dimostrato, e alcuni pensano anche a un ospite intermedio.

Dei vari sarcosporidî finora descritti a noi interessa uno trovato nell'uomo; cioè la



Sarcocystis Lindemanni.

Fu detta così dal Rivolta in onore del russo Lindemann, che nel 1863 accennò a corpuscoli di Miescher nell'uomo.

In realtà se ne conosce nell'uomo un solo caso certo, descritto a Nancy da Baraban e Saint-Rémy nei muscoli laringei di un giustiziato: si manifestava sotto forma di cisti di grandezza varia fino a 1.6 millimetri (fig. 422, parte superiore taglio trasverso; parte inferiore taglio longitudinale della cisti) contenenti spore o corpuscoli bananiformi della lunghezza di 8-9 μ.

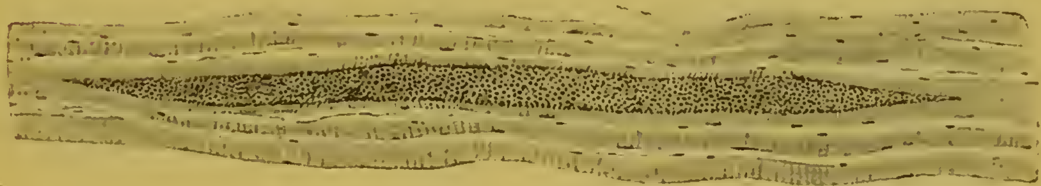


Fig. 422. — *Sarcocystis Lindemanni.*

Un altro caso, non ben però determinato, fu descritto a Mosca da B. Rosenberg: si trattava di una cisti del miocardio piena di corpuscoli ovali, reniformi, oviformi, ecc.

Apiosomi o Pirosomi.

Vicini agli emosporidî sono i *Pirosomi*, detti anche *Apiosomi*, o *Piroplasmi*, o *Babesie*, e li incontriamo assai diffusi nei mammiferi più utili (buoi, cavalli, cani, ecc.).

Si tratta di parassiti (Tav. III) che vivono nel globulo rosso, ma non lo invadono intieramente nè trasformano l'emoglobina in melanina.

Si presentano nel sangue degli animali infetti con varie forme, rotondeggianti, a clava, piriformi; hanno un corpo protoplasmatico che si colora poco intensamente, spesso nel centro è del tutto scolorato, e presenta uno o due granuli di cromatina. Le forme a pera sono interpretate quali gametociti: mentre il ciclo asessuale si compie per semplice divisione nel sangue del mammifero, i gametociti nel corpo di speciali zecche iniziano un secondo ciclo di vita sessuale.

La trasmissione da animale ad animale avviene dunque in natura per l'intermezzo delle zecche, e per lo più attraverso le loro uova: da queste l'infezione si propaga per le giovani zecche o solo nello stadio larvale e ninfale, ovvero soltanto nello stadio adulto, ovvero in tutti e tre gli stadî di larve, ninfe o insetto adulto.

Finora con la inoculazione di sangue infetto si è riprodotta la malattia soltanto da bue a bue, da cane a cane, da pecora a pecora.

La piroplasmosi del bue e del cavallo può essere associata colla rispettiva peste bovina ed equina prodotta da virus filtrabili, ovvero con infezioni batteriche secondarie, o anche nel bue con la tripanosomiasi.

I sintomi generali delle pirosomiasi, o piroplasmosi, o babesiosi sono: febbre, prostrazione di forze, anemia, ittero, emoglobinuria più o meno manifesta. Clinicamente si distingue una forma acuta e una forma cronica.

Mentre dopo certe infezioni batteriche si ha immunità, e nell'organismo immune i rispettivi germi patogeni non attecchiscono più qualora siano nuovamente inoculati, così invece non accade nelle piroplasmosi.

Era già noto che i bovini immuni contengono nel loro sangue il pirosoma bigemino.

Analogamente per la piroplasmosi canina si è dimostrato (Theiler) che dopo guarita la malattia si ha una immunità consecutiva, ma il sangue contiene sempre piroplasmi che possono riprodurre la malattia inoculati nei cani suscettibili.

Artificialmente immunizzando in alto grado i cani, mediante successive inoculazioni di sangue infetto, defibrinato, si può ottenere un siero che ha virtù preventive, ma il sangue dei cani iperimmunizzati se inoculato si mostra sempre patogeno.

Invece il semplice siero di animali iperimmunizzati se inoculato in cani suscettibili, agisce preventivamente contro i pirosomi che sono presenti nel rispettivo sangue. Questo siero contiene una sostanza preventiva che a 55° C. non viene distrutta.

Sicchè il meccanismo della produzione dei sieri preventivi nella piroplasmosi è analogo a quello delle infezioni batteriche, con la differenza però che il sangue dei cani altamente immunizzati rimane sempre virulento pei cani indenni e suscettibili.

Il chinino, così specifico contro gli emosporidî dell'uomo, non agisce contro i pirosomi.

Conosciamo le seguenti principali specie di pirosomi:

1. *Piroplasma bovis* (sin. *Pirosoma* od *Apiosoma bovis*, *Babesia bovis*).

Fu trovato, la prima volta, da Smith e Kilborne nella febbre dei bovini del Texas, e poi in moltissime regioni dell'uno e dell'altro emisfero. È assai diffuso anche in Europa. In Italia è frequente nell'Agro romano e in Sardegna.

Nel sangue infetto si presenta a fresco (fig. 423) in forma isolata, piccola, rotonda, con torpido movimento ameboide, talvolta anche in numero di 3-8 in uno stesso globulo rosso, e spesso, in forme di pera per lo più riunite a due a due per le estremità affilate.

Con la colorazione tripla (Tav. III, fig. 1-2) nel protoplasma colorato in turchino si vedono granulini di cromatina; questa nei gametociti può esser divisa in due piccole masse ben distinte.

Secondo Schaudinn e Weber tale dimorfismo del nucleo (macro- e micronucleo) stabilirebbe una parentela coi tripanosomi.

Non è ancora ben noto con precisione come avviene nel sangue la monogonia.

Quanto alla sporogonia, i corpi bigemini a pera hanno la significazione di veri gametociti; essi nello stomaco delle zecche abbandonano, secondo



Fig. 423. — *Piroplasma bovis.*

Koch, i globuli rossi; la cromatina si dispone ad uno dei poli, che assume una figura a raggi; queste forme raggiate si vedono accoppiate a due a due, come in copulazione. Successivamente si vedono delle forme a pera, come di oocineti, e infine, dentro ciascuna delle uova infette, una forma 2-4 volte più grande dei pirosomi nel sangue.

La trasmissione della malattia si fa per mezzo delle zecche *Rhipicephalus annulatus* (sin. *Boophilus bovis, Ixodes bovis s. ricinus* Lin.), *Rhipicephalus australis* ed *Evertsi* e in Europa per mezzo anche dell'*Ixodes reduvius* (sin. *Ix. ricinus* Megnin, ed *Ix. hexagonus* Leach) (v. *Parassitologia*, pag. 1072 e seguenti). Mentre però solo le larve di ripicefalo trasmettono la piroplasmosi, la trasmettono le larve, le ninfe e gli insetti adulti del genere *Ixodes*.

Poichè l'infezione è per mezzo delle uova trasmissibile da madre a figlie, così mantengonsi infetti certi luoghi o pascoli.

Si conosce di questa malattia una forma leggera e una forma grave.

La *forma leggera* colpisce i vitelli. Questi dopo circa due settimane si ristabiliscono del malessere e possono anche acquistare un'*immunità consecutiva.* A questo modo si spiega perchè i bovini bradi della campagna romana ne sono colpiti rarissimamente, e invece le vacche svizzere o lombarde od olandesi importate muoiono quasi tutte, se nei mesi di estate e autunno non si tengono alla stalla.

Dopo che la malattia nei vitelli è finita possono a lungo persistere nel sangue i parassiti.

La *forma grave* è caratterizzata da febbre alta (40°-41°), abbattimento, anoressia, anemia acuta, subittero, emoglobinuria, diarrea talvolta sanguinolenta. La morte nei casi più gravi si ha in 48 ore; le guarigioni sono rare. Le recidive, quando vengono, sono sempre più leggere.

È una epizoozia estivo-autunnale; ma se n'ebbe anche una primaverile nel 1903 a Roma.

La cura coi chinacei è inefficace.

La *profilassi* consiste nel non mandare al pascolo le vacche nei mesi caldi, nè in quelli autunnali fino alle prime brinate, quando le zecche cominciano ad ibernare.

Per distruggere le zecche si consigliano le nebulizzazioni di olio di paraffina al 25-50 % di acqua. Purtroppo però non abbiamo ancora un mezzo sicuramente efficace.

Si è tentata, ma con poco successo, l'inoculazione preventiva del sangue dei vitelli naturalmente immunizzati agli animali adulti.

Una varietà di piroplasmosi bovina fu descritta da Lignières nell'Argentina.

Si differenzia perchè si hanno forme rotonde come di diplococco lanceolato e *non mai forme a pera*. Si hanno poi questi altri caratteri differenziali:

si può inoculare ad animali vaccinati contro la varietà tossica di pirosoma bigemino;

l'incubazione è più lunga (8-12 giorni), l'evoluzione della malattia è più lenta;

non si ha anemia perniciosa. L'emoglobinuria non c'è od è un fenomeno premortale.

2. *Piroplasma parvum* (*Pir. rhodesianum*).

I corpi piriformi sono *più piccoli* del pirosoma bigemino; nel 1° stadio della malattia sono poco numerosi, ma aumentano giorno per giorno, e arrivano od essere più numerosi che nella febbre del Texas.

Si accumulano in alcuni organi in modo da ostruire i vasi e produrre infarti. Restano nel sangue anche dopo guarita la malattia.

La malattia è gravissima; dà perfino il 90 % di letalità: non si ha emoglobinuria.

La malattia sofferta conferisce immunità come avviene dopo la febbre del Texas; ma non si riproduce come questa con la inoculazione di sangue infetto a bovino suscettibile e sano; si riproduce invece un'infezione benigna, che serve a immunizzare gli animali per 5-6 mesi. Così agisce anche il sangue degli animali guariti.

L'intermediario sarebbe il *Rhipicephalus decoloratus* (zecca bleu), e, secondo Nuttal, il *Rhipicephalus Shipleyi* e *appendiculatus:* le zecche non trasmettono però la infezione ereditariamente ma si infettano allo stato ninfale e trasmettono l'infezione allo stato adulto.

Un altro pirosoma del bue che rassomiglia al *Pir. parvum* e che è diffuso assai nell'Africa è il *Piroplasma mutans*, il quale dà una malattia leggera ed è inoculabile da bue a bue.

3. *Piroplasma canis* (sin. *Babesia canis*). (Tav. III, fig. 13-24).

Fu trovato da Piana e Galli-Valerio nei cani bracchi, portati a cacciare dai monti alle marcite lombarde: in seguito è stato trovato qui in Campagna romana e poi in Francia, nell'Africa del Sud e nell'Eritrea.

Come del precedente non è conosciuto lo sviluppo completo.

Si presenta pure con forme rotonde e a pera (Tav. III, fig. 21, 22, 23).

Si differenzia dal precedente, nello stadio monontico, per un movimento ameboide più vivace e per la molteplicità di forme entro uno stesso globulo rosso.

Le forme a pera sarebbero i gametociti.

Questo piroplasma è *il più grande* di quelli finora conosciuti.

PIROPLASMI

Piroplasma bovis



Piroplasma canis



Piroplasma equi



Piroplasma ovis



Unione Tip.-Editrice Torinese.

L'inoculazione del sangue riesce da animale ad animale. In natura la malattia è trasmessa in Africa per mezzo della zecca del cane, *Haemaphisalis Leachi*; in Europa forse si trasmette per mezzo del *Dermacentor reticulatus* (v. pag. 1082).

Si ha una forma acuta febbrile con ittero ed ematuria, e una forma cronica che per lo più termina con la guarigione. A differenza dei bovini, gli animali più giovani sono più facilmente colpiti e la malattia ha un decorso più grave.

Dopo la guarigione apparente rimangono nel sangue i parassiti per lungo tempo.

Il siero di sangue di animali guariti iniettato ad alte dosi, e anche più il siero di sangue di animali iperimmunizzati dànno un'immunità di breve durata.

È assai dubbio che la chinina abbia un'azione curativa specifica come nella malaria dell'uomo.

4. *Piroplasma equi* (sin. *Babesia equi*).

Fu descritto la prima volta nel 1897 dal Guglielmi nel Leccese, poi da Danysz e Bordet nel 1898 nel Transvaal e più tardi nel 1901 da Theiler in una malattia acuta dei cavalli, e poi di nuovo dal Guglielmi nel 1903-1904, in Germania e nel Venezuela da Ziemann, e da Baruchello e Mori a Roma nel cosidetto tifo dei cavalli.

Fu ritrovato anche nei cavalli del Madagascar dal Thiroux in una malattia cronica. I cavalli erano affetti da un'osteomalacia che prima era attribuita a mancanza di fosfati negli alimenti: la malattia invece non è una semplice e vera osteomalacia, ma è accompagnata da cachessia, paraplegia, osteoporosi con fratture spontanee: forse si tratta di un'infezione mista.

Altre volte l'infezione decorre in modo acuto febbrile, oppure in forma di una anemia che conduce alla cachessia come nei casi di Theiler.

Però anche nelle forme più gravi la letalità di solito non supera il 30 %.

In ognuno dei casi si trovano nel sangue forme libere o intraglobulari, rotonde o piriformi e (ciò che le differenzia da altri piroplasmi) assai spesso a croce di Malta (Tav. III, fig. 30). Le forme a pera emettono prolungamenti che sono forse i microgameti (fig. 35-36).

La malattia pare trasmessa dalle seguenti zecche: *Rhipicephalus decoloratus* ed *Evertsi*, *Hyalomma aegyptium* (v. pag. 1081). Infettando allo stato ninfale o larvale il *Rhip. Evertsi* si riuscì a propagare la malattia con la stessa zecca allo stato adulto.

Secondo Theiler il piroplasma trovato nel mulo e nell'asino pare identico a quello del cavallo. Soltanto, il cavallo è il più suscettibile, meno lo è l'asino e meno ancora il mulo.

5. *Piroplasma ovis* (sin. *Haematococcus ovis* di Babès, *Amoebosporidium poliphagum* di Bonome, *Babesia ovis*).

Fu osservato la prima volta in Rumenia, da Babès nel 1888 e poi a Padova da Bonome, e quindi in Turchia, Francia, ecc.

La malattia è caratterizzata da una ittero-ematuria febbrile e nei casi acuti per lo più fatale.

Le fig. 37-42 della Tav. III sono, colorate col bleu di metilene (fig. 37-40) e con una colorazione nucleare (fig. 41-42); la fig. 42 indica forme di gametociti negli organi interni.

Nelle pecore di Eritrea, Memmo, Martoglio e Adani trovarono una piroplasmosi non differenziabile da quella bovina. Sembra sia stata trovata anche nell'Africa del Sud, e in America nelle Montagne Rocciose.

Come la piroplasmosi canina e bovina, artificialmente si trasmette anche questa ovina con le inoculazioni di sangue. Si trasmette in natura per mezzo del *Rhipicephalus bursa* (v. pag. 1081) allo stato adulto (Mothas).

Piroplasmosi nell'uomo (?) — Il cosidetto *Piroplasma hominis* che Wilson e Clowning dissero di aver trovato nel sangue dei malati di febbre petecchiale da punture di zecche nelle Montagne Rocciose, non fu confermato da Wardele Stiles; come non venne finora confermata l'osservazione di Gotschlich, secondo cui nel tifo petecchiale si troverebbe entro il sangue una specie di piroplasma, trasmissibile con la puntura delle cimici.

Il cosidetto *Piroplasma donovani* nel *Kala-azar* (splenomegalia tropicale) non appartiene come vedremo a questo genere di parassiti.

Si è supposto, ma non fu dimostrato, che anche l'emoglobinuria dello uomo, almeno in alcune sue forme, sia prodotta da pirosomi, analogamente all'emoglobinuria dei buoi e di altri mammiferi.

Leishmanie.

Si credevano piroplasmi, ma invece stanno piuttosto fra questi e i tripanosomi.

Prima il Leishman nel 1900, poi nel 1903 il Donovan e poi altri rinvennero forme parassitarie speciali in abitanti dei tropici (India, Cina, Africa) o in reduci da queste regioni, in preda a febbri irregolari, refrattarie al chinino e ad ogni altra cura, affetti da *Kala-azar* o *Kala-dunkh*, cioè *splenoepatomegalia*, con emaciazione, edemi parossistici dei piedi, certe volte anche emorragie petecchiali sottocutanee, ulceri o cancrene locali della pelle, anemia progressiva, cachessia accompagnata da febbre quotidiana e seguita da morte in pochi mesi.

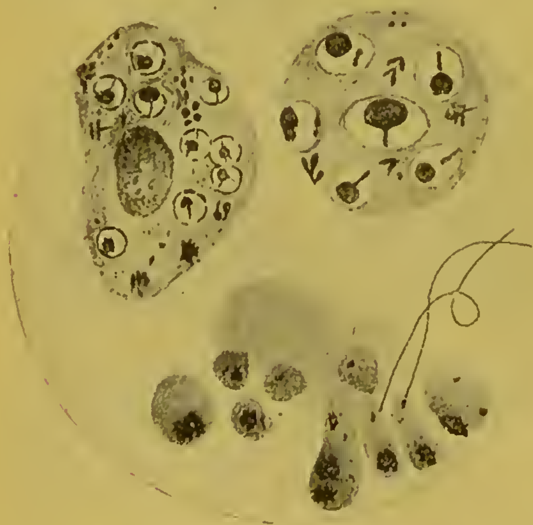


Fig. 424. — *Leishmanie* (da Christophers).

Si possono avere anche dei casi cronici con febbre lieve o nulla, piccolo tumore di milza, poca anemia, profondo malessere. La morte accade per qualche malattia intercorrente.

In ogni caso, nel sangue della milza, del fegato, del midollo osseo, di rado nei leucociti del sangue periferico, si trovano forme ovali o circolari, con granuli di cromatina dei quali uno più grande rotondo, ed uno piccolo, di solito a bastoncino.

Molte, o, secondo altri, tutte sarebbero fuori dei globuli rossi, ma per lo più (fig. 424, parte superiore) dentro globuli bianchi e dentro cellule en-

doteliali dei capillari; nelle forme cachettiche, anzi, è a preferenza colpito l'endotelio vasale.

La parentela coi tripanosomi è fondata: sulla presenza del centrosoma, oltre al nucleo; sulle forme che si osservana nelle colture; sulle fagocitosi attive negli organi ematopoietici, come in certi casi di tripanosomiasi; sulla somiglianza del quadro clinico.

In un focolaio di anemia splenica infantile presso Napoli il Pianese ha per primo descritto la presenza nella milza di alcuni corpi perfettamente simili a quelli di Leishman; e poco dopo il Nicolle insieme con vari collaboratori ha riscontrato lo stesso parassita in una affezione abbastanza diffusa in Tunisia fra i bambini, e che dà quali sintomi clinici splenomegalia, epatomegalia, febbri irregolari, cachessia. Il Nicolle potè ottenere colture del parassita in agar-sangue secondo Novy e Mac Neal (vedi pag. 1159) o in una modificazione di questo terreno da lui proposta; riconobbe nei cani la infezione spontanea da corpi di Leishman: e riprodusse l'infezione sperimentalmente nel cane e nella scimmia. Il Gabbi, il Feletti ed altri autori ebbero reperti uguali da malati in Sicilia e in Calabria; il Concetti a Roma: perciò dobbiamo ammettere che questo Kala-azar infantile, prodotto da un parassita identico o molto simile a quello di Leishman-Donovan, è diffuso in tutto o in gran parte dal bacino del Mediterraneo. Gli autori italiani hanno inoltre descritto alcuni casi anche in adulti.

La moltiplicazione sarebbe per scissione longitudinale o a rosetta.

È probabile, ma non accertato, che si trasmettano con la puntura di insetti.

Si riuscì a coltivarli dal sangue dei malati, specie dalla milza, con aggiunta di citrato di soda, a 22° C. circa, e si sono così viste sviluppare forme che ricordano i tripanosomi (fig. 424, parte inferiore) senza però membrana ondulante e con un flagello poco sviluppato.

Anche nell'*ulcera tropicale endemica* (cosidetto *Delhi-Sore*, *Delhi-Beule*), una malattia cutanea locale, senza fenomeni generali, il Wright nel 1903 fuori dei globuli rossi, entro i globuli e le cellule endoteliali ha descritto corpi molto analoghi a quelli di Leishman-Donovan.

Pare che la malattia sia trasmessa con le punture di insetti, e forse anche per diretto contagio. In Tunisia il Nicolle, in Italia il Basile ed altri hanno riscontrato corpi di Leishman nel cane; il quale avrebbe una parte importante nella epidemiologia del Kala-azar; e il Basile stesso e il Sangiorgi hanno potuto dimostrare lo stesso parassita nell'intestino della pulce del cane (*Pulex serraticeps*) (vedi pag. 1100).

Ma poichè eziandio nella splenomegalia si possono avere ulcerazioni cutanee e nei tessuti di granulazione si ritrovano i corpi di Leishman-Donovan, così Cristhophers crede che l'ulcera tropicale endemica sia la infezione locale e la splenomegalia l'infezione generale della stessa malattia.

Finalmente anche nel *bottone di Aleppo o d'Oriente*, diffuso anche nel Caucaso, Marzinowsky e Bogrow hanno trovato protozoi analoghi, per lo meno, a quelli trovati da Wright nell'ulcera tropicale endemica. Stanno fra i pirosomi e i tripanosomi: si vedono sempre inclusi nel protoplasma delle cellule mononucleari dei tessuti infiltrati di granulazione. È stato riscontrato il bottone d'Oriente, col tipico reperto parassitario, anche a Catania.

***

Le leismanie ci aprono la via allo studio dei flagellati. Di questi ci interessano due famiglie, quella dei *mastigofori*, e più assai quella dei *tripanosomidi*.

Mastigofori.

Fra questi protozoi flagellati non ne abbiamo di patogeni veri e propri.

Il gen. *Cercomonas* (senza membrana ondulante) fu indicato come parassitario dal Dujardin fino dal 1° terzo del secolo scorso; e poi trovato nella cancrena polmonare e nella pleurite putrida, senza però che sia affatto causa di questa malattia.

Il gen. *Trichomonas*, caratteristico per 3-4 flagelli e una membrana ondulante, ha 2 specie:

a) *Trichomonas vaginalis* di Donné, vive nella vagina della donna, nei catarri di reazione acida; muore in ambiente alcalino; si è trovato solo nel 30-40 % dei casi esaminati, e non è patogeno;

b) *Trichomonas hominis, s. intestinalis* di Davaine (fig. 425), si distingue dal precedente per essere più piccolo, e perchè vive in ambiente alcalino;

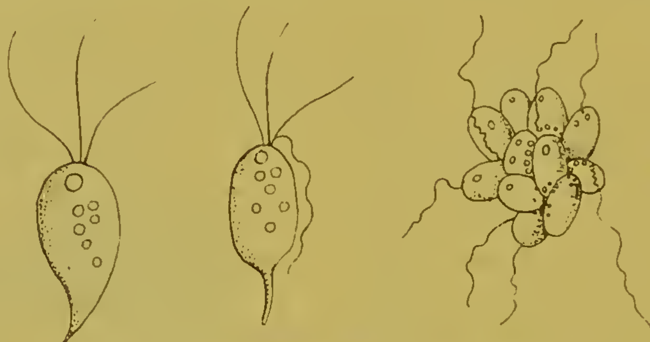


Fig. 425. -- *Trichomonas hominis* (da Doflein).

perciò si è rinvenuto nell'intestino di adulti e bambini, sani e malati delle più diverse malattie intestinali.

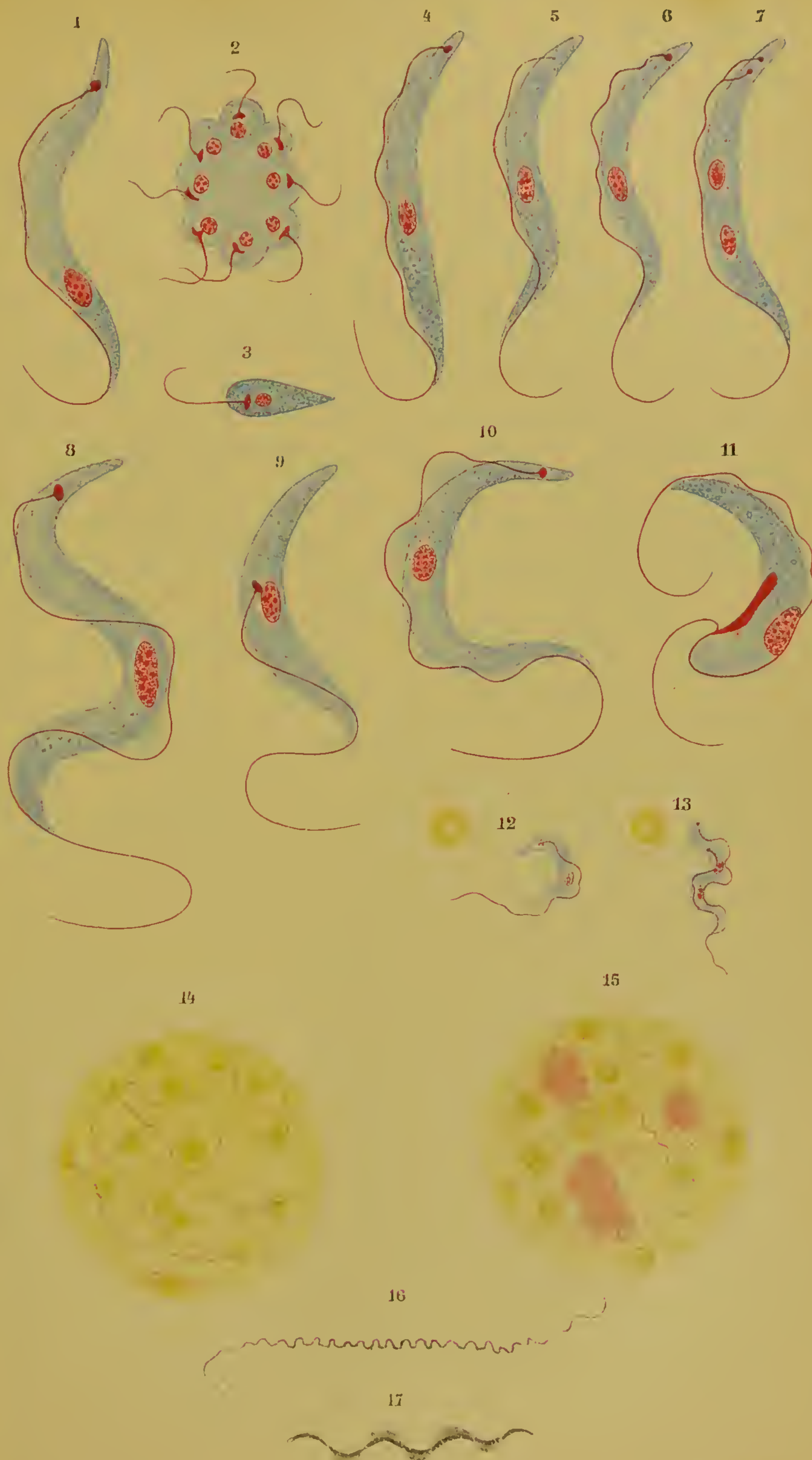
Non si trova mai nelle diarree dei lattanti. Non si conosce con sicurezza la forma delle cisti in vita libera. Manca di qualsiasi azione patogena. Forme analoghe o identiche si rinvennero nella cancrena polmonare e in essudati pleurici.

Il gen. *Lamblia* o *Megastoma* è caratteristico per avere un corpo con simmetria bilaterale, e all'estremità anteriore un paio di flagelli, nel mezzo due paia e nell'estremità posteriore ancora un altro paio, in tutto 8 flagelli: nella parte anteriore ha una concavità (fig. 426, *A*, *B*) simile ad una ventosa per cui aderisce alle cellule intestinali.

La fig. 426 mostra appunto la *Lamblia* o il *Megastoma intestinale*, libero (*A*, *B*), o aderente (*C*) alle cellule intestinali.

Nella fase di riposo (*D*) presenta una figura piriforme, e nella fase cistica (*E*) si presenta in forma di corpi ovali, brillanti, lunghi 8-10 μ, larghi 8-9 μ,

TRIPANOSOMIDI



1-3, *Tr. Lewisi.* — 4, *Tr. Brucei.* — 5, *Tr. equinum.* — 6-7, *Tr. gambiense.* — 8, *Tr. Theileri.* — 9, *Tr. transvaaliense.* — 10, *Tr. avium.* — 11, *Trypanoplasma Borreli.* — Le figure 1-11 sono a 2000 diametri e colorate col bleu Borrel (da Laveran e Mesnil). — 12-13, *Tr. Brucei*; 750 diametri. — 14, *Spirochaeta Obermeieri* nel sangue; 500 diametri. — 15, *Treponema pallidum* nel succo di papula sifilitica; diametri 750; nella stessa figura a destra una *Spirochaeta refringens.* — Le figure 12-15 sono colorate col metodo Marino. — 16, Schema di *Treponema pallidum.* — 17. Schema di *Spirochaeta refringens* (da Schaudinn).

Unione Tip.-Editrice Torinese.

con membrana molto rifrangente che lascia intravedere nell'interno un contenuto cellulare che ricorda la forma del megastoma col relativo processo caudale ripiegato sul corpo.

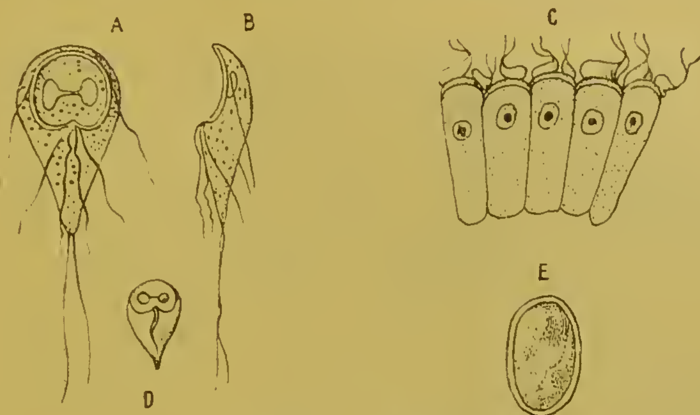


Fig. 426. — *Lamblia.*

Nei casi osservati nell'uomo si aveva stitichezza alternata a diarrea profusa; ma simili disturbi intestinali si possono anche avere indipendentemente da questo protozoo, che perciò non è certo abbia una decisa azione patogena anche quando è aderente in gran numero alle cellule nel duodeno e nel digiuno. Nel crasso si vedono solo le cisti.

* * *

In alcuni flagellati di animali a sangue freddo il Prowazek ha descritto una generazione alternante, cioè un doppio ciclo di sviluppo, vegetativo e sessuale; ognuno di questi due cicli può, a sua volta, svolgersi secondo due tipi, quello sessuale, per es., mediante autogamia ed eterogamia. L'eterogamia fu osservata anche nel tricomonade intestinale e nella lamblia, nel primo, forse, anche l'autogamia.

Tripanosomi.

I tripanosomi (Tav. IV) vivono parassiti nel plasma del sangue e così trovansi molto diffusi in tutte le classi dei vertebrati, cioè nei pesci, batraci, rettili, uccelli, in molti mammiferi, grandi o piccoli, e nell'uomo. Hanno perciò grande importanza nella patologia umana e veterinaria. Le malattie che ne derivano, le cosidette *tripanosomiasi*, sono fra le più diffuse alla superficie della terra.

Queste tripanosomiasi, nei mammiferi più grossi (bovini, equini, ovini) si manifestano con la distruzione di emazie, onde anemia acuta e subacuta, che, trattandosi di un parassitismo estraglobulare del sangue, si può spiegare ammettendo che i parassiti producano una emolisina, ovvero sottraggano elementi nutritivi ai globuli rossi.

Si ha inoltre tumore di milza, rigonfiamento delle ghiandole linfatiche, e non di rado si producono orticarie, edemi emorragici locali della pelle o

degli organi genitali. Non mancan mai il dimagramento, l'emaciazione progressiva, fino alla cachessia.

La febbre nella infezione acuta è o continua o intermittente, o remittente e come ricorrente.

I tripanosomi sono corpicciuoli protoplasmatici fusiformi, più o meno affilati, con due masse cromatiche nucleari, una piccola, generalmente all'estremità posteriore, il cosidetto centrosoma o micronucleo o blefaroplasto; l'altra quasi sempre mediana, più grossa, il nucleo o macronucleo. Dal centrosoma parte un filamento cromatico che va lungo il bordo di una membrana che vivacemente ondulando fa prendere la figura di un trapano, onde il nome. Il filamento cromatico si prolunga e termina in un flagello che sporge dall'estremità anteriore.

Il centrosoma può essere circondato da un alone chiaro e in tal caso rassomiglia al nucleo dei flagellati; colorandosi può assumere varie forme, certe volte mostra vari corpicciuoli colorati o cromosomi disposti in modo da ricordare un processo cariocinetico. Esso è il centro sensitivo motore della vita di relazione; è perciò la radice del filamento cromatico e del flagello, ed è inoltre anche centro cinetico interno per la riproduzione.

Il macronucleo si colora in paonazzo per la cromatina che contiene; ha varia struttura; mostra certe volte anche vari cromosomi, e può mostrare anche due specie di sostanza cromatica diversamente colorabile.

Il protoplasma si colora in turchino più o meno intenso, con zone più chiare e più cupe: le zone più chiare, o pseudovacuoli, non hanno alcuna importanza speciale. Nel protoplasma sono sparsi granuli più grossi che si colorano in violetto cupo, e sono molto variabili per numero, forma e dimensioni.

L'estremità anteriore, che termina col flagello, è per lo più affilata; l'estremità posteriore è più o meno tozza nelle diverse specie e negli stessi individui d'una stessa specie.

La nutrizione si fa per osmosi, senza inclusione di sostanze solide.

Una specie di pellicola circonda il corpo cellulare dei tripanosomi e va col nome di *periplasto*: pel modo come si colora, usando speciali artifizi, sembra un prodotto nucleare.

Il movimento di traslazione è dovuto alla membrana ondulante e al flagello. Si ha poi un movimento di contrazione del protoplasma e un movimento a tipo ameboide nell'estremità posteriore.

La moltiplicazione ha luogo per divisione longitudinale, che parte sempre dal centrosoma; seguono il macronucleo e la membrana ondulante, e finisce per prendervi parte il protoplasma (fig. 427, E-H).

Avverrebbe, secondo alcuni, anche una divisione trasversale o anche a rosetta (Tav. IV, fig. 2 e fig. 427, N, O).

Altri autori (Ziemann, Prowazek, Koch, ecc.) differenziano in alcune specie di tripanosomi due forme sessuali: le femminili prenderebbero un

colorito più scuro, le maschili avrebbero la cromatina disposta a cordoncino. Una moltiplicazione sessuale non è ben dimostrata: però sarebbe stata veduta una coniugazione da Prowazek nel *Trypan. Lewisi* e nel *Trypan. Brucei.*

Fuori dell'organismo si conservano col sangue più o meno *in vitro*;

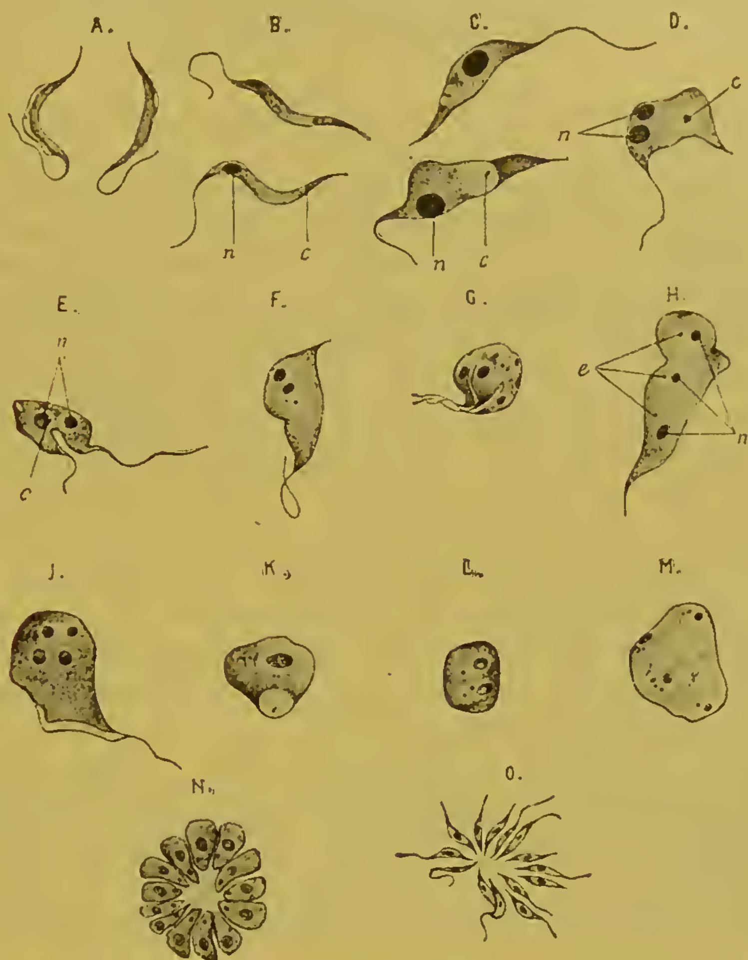


Fig. 427. — Tripanosomi in moltiplicazione (da Doflein).

ma la stessa acqua ordinaria o distillata, e molte sostanze chimiche li distruggono.

Resistono fra 40° e 0° C.: sopra e sotto questi limiti muoiono più o meno rapidamente. Prima di morire mostrano varie trasformazioni, come vacuolizzazioni, degenerazioni grasse, disgregamenti, agglutinazioni.

Nelle colture (v. pag. 1159) si hanno forme per lo più senza membrana ondulante e di tutte le grandezze, anche di quelle che possono traversare i filtri di Berkefeld. La temperatura migliore per coltivarli è di 30°-37° C.; però meno bene riesce coltivare quelli più patogeni.

La virulenza varia con le specie animali inoculate, come pure con la razza dei mammiferi e col passaggio attraverso determinate specie di animali.

Si propagano di certo per opera di insetti succhiatori di sangue (Pulci, Glossine, Ippoboschi e forse *Stomoxys*): non conosciamo però ancora per quale meccanismo intimo ciò avvenga.

Con le successive inoculazioni di sangue di animali infetti ad animali sani si può mettere in evidenza un principio di agglutinazione.

I sieri specifici che si possono così ottenere sono sempre agglutinanti, raramente paralizzanti del movimento dei tripanosomi, e non mai microbicidi.

Un animale guarito da una prima infezione non ne contrae una seconda.

L'immunizzazione artificiale mediante inoculazioni successive o progressive di sangue virulento, quand'anche preservi l'animale inoculato, non per questo fa scomparire dal sangue i tripanosomi. Quindi gli animali vaccinati sono sorgente d'infezione non meno di quelli non trattati.

I sieri specifici che si ottengono con la immunizzazione attiva mediante successive e progressive inoculazioni di sangue infetto, spiegano azione preventiva solo contemporanea all'innesto: la azione loro curativa è sempre limitata ed incerta. Il meccanismo di questa parziale immunità sembra sia di ordine cellulare o leucocitario anzichè umorale.

Il siero di sangue umano ucciderebbe *in vitro* e nei piccoli mammiferi alcuni tripanosomi delle malattie di animali.

Risultati terapeutici si sono avuti in alcune tripanosomiasi in seguito alla somministrazione di sostanze chimiche, specialmente l'atoxyl, il tripanroth, il tripanrosan, il tartaro emetico.

Rapporto fra emosporidî e tripanosomi. — Secondo le ricerche di Schaudinn, nello stomaco delle zanzare (*Culex pipiens*) i zigoti dello *Haemoproteus* (sin.: *Halteridium*) *noctuae* (Celli e Sanfelice) si svilupperebbero sotto l'aspetto di tripanosomi.

Schaudinn così descrive il ciclo di sviluppo di questo alteridio della civetta:

Avvenuta, nel sangue della civetta o nello stomaco della zanzara, la fecondazione di un gamete femminile per opera di un microgamete, si ha la formazione dell'oocinete. Nell'intestino medio del *Culex pipiens* gli oocineti si differenziano in forme indifferenti, femminili e maschili.

Le forme indifferenti per successive divisioni eteropolari del nucleo si trasformano in un tripanosoma che si moltiplica per divisioni longitudinali dando luogo a varie generazioni di tripanosomi indifferenti fra i quali alcuni si differenzieranno in maschili e femminili. Gli oocineti femminili si trasformano anche, con lo stesso processo, in tripanosomi, dopo che è avvenuta in essi una riduzione della cromatina nucleare. Questi tripanosomi provenienti dall'oocinete femminile non sono capaci di dividersi longitudinalmente. Per un processo di partenogenesi possono dar luogo però alla formazione di tripanosomi maschili, femminili e indifferenti.

Gli oocineti maschili, con un complicato processo di moltiplicazione nucleare dànno luogo alla formazione ciascuno di otto piccoli tripanosomi

maschili, e questi, se non vengono inoculati nella civetta, sono destinati a perire.

I tripanosomi indifferenti e i femminili sono capaci di riprendere l'aspetto gregariniforme quando nell'intestino della zanzara non trovano condizioni favorevoli, e dallo stato di gregarina poi (specialmente gli indifferenti) ritornano, in condizioni opportune, alle forme di tripanosomi. Le forme di gregarine femminili sono resistentissime alle condizioni di vita sfavorevoli, ed hanno perciò grandissima importanza per la conservazione della specie.

Nella civetta vengono inoculate dalla zanzara le forme di tripanosoma prevalentemente indifferenti. Questi attaccano gli eritrociti riducendo il loro apparato di locomozione e aumentando il volume a spese dell'emoglobina del globulo rosso: riprenderebbero periodicamente la forma di tripanosoma e cambierebbero così di cellula ospite; si dividerebbero per scissione longitudinale come tripanosomi quando hanno raggiunto un certo sviluppo. Dalle forme indifferenti si differenzierebbero i gameti maschili e femminili e con la formazione dell'oocinete si chiuderebbe il complicato ciclo di sviluppo, qui descritto per sommi capi.

Questi fatti, che ammetterebbero una così stretta parentela fra emosporidî e tripanosomi, meritano conferma.

La diagnosi differenziale dei vari tripanosomi non è facile; bisogna ricorrere quindi a varî criteri: caratteri morfologici e biologici; sintomi della malattia naturale o spontanea; azione patogena sperimentale nei più differenti animali; azione patogena in animali già immunizzati con altre specie vicine di tripanosomi; modi di propagazione naturale.

Tenuto conto di tutti questi diversi criterî, fino ad oggi vennero nel sangue dei mammiferi trovati e classificati questi principali tripanosomi (Tav. IV).

1. *Trypanosoma Lewisi* (fig. 1-3), nel sangue dei ratti o topi di fogna; nella fig. 1 se ne vede una forma adulta, nella fig. 2 una moltiplicazione a rosetta, nella fig. 3 una forma giovane; si trasmette per mezzo della pulce e del pidocchio dei ratti (*Haematopinus spinulosus*); è patogeno solo per il ratto;

2. *Trypanosoma Theileri* (fig. 8), causa del *Mal della bile* del Transvaal, patogeno nei soli bovini, il doppio più grande degli altri suaccennati; una varietà di questo, il *transvaliense* (fig. 9), si differenzia per avere il centrosoma non periferico, ma centrale e prossimo al nucleo; pare si trasmetta per mezzo della *Hippobosca rufipes;* è patogeno solo per i bovini;

3. *Trypanosoma Brucei*, causa della *Nagana*, che produce grandi stragi di bestiame (bovini, equini, ecc.) nel sud, est ed ovest dell'Africa ed è trasmessa dalla *Glossina morsitans* o mosca tse-tse; nella fig. 4 se ne vede una forma adulta ingrandita 2000 diametri, nella fig. 12 una forma pure adulta, ma al comune ingrandimento di 750 diametri, nella fig. 13 una forma in divisione longitudinale;

4. *Trypanosoma Evansi*, causa della *Surra*, che attacca gravemente i cavalli, poco gravemente i bovini nelle Indie; clinicamente la malattia è molto simile alla *Nagana*; sono molto simili anche i rispettivi tripanosomi; differisce solo perchè è trasmessa da altri insetti (*Stomoxys nigra* e *calcitrans*)

e i caprini ed ovini immunizzati per la *Surra* sono pure sempre sensibili alla *Nagana*;

5. *Trypanosoma dimorphon*, che attacca i cavalli del Gambia, ed è caratteristico perchè assume varie forme di varia grandezza;

6. *Trypanosoma equinum* (fig. 5), causa del *Mal de Caderas* o malattia del groppone, che nell'America del Sud attacca i cavalli e i bovini, questi però non ne ammalano; pare si trasmetta per mezzo di una *Stomoxys*; il rispettivo tripanosoma si distingue perchè ha il micronucleo così piccolo che può sfuggire all'osservazione;

7. *Trypanosoma equiperdum*, causa della *Durina* di Algeria è il solo trovato finora in Europa (Francia, Germania, Austria, Russia, Turchia) nel morbo cosidetto coitale, perchè si trasmette col coito dei cavalli stalloni; si distingue anche perchè i cani immunizzati con la *Durina* sono capaci di contrarre la *Nagana* e il *Caderas*.

Ma di tutti questi vari tripanosomi, finora trovati nel sangue dei mammiferi, per noi il più interessante, perchè si è ritrovato nell'uomo, è il

Tripanosoma gambiense.

Fu rinvenuto la prima volta nel 1901 da Everett Dutton, durante la febbre, in un uomo, che era stato parecchio tempo sulle rive del Gambia (Africa Inglese).

I sintomi che l'infermo presentava e che costituiscono la sindrome della cosidetta *malattia di Dutton*, erano:

Anemia, debolezza estrema alle gambe, denutrizione generale; ipertrofia dei gangli linfatici specialmente cervicali, febbre intermittente a tipo irregolare, cioè temperatura non molto alta per 1-4 giorni con remissioni mattutine, e apiressia per 2-5 giorni con temperatura normale o subnormale; edemi passeggeri delle estremità inferiori e delle palpebre; iperemia o chiazze iperemiche della pelle e talora della congiuntiva; chiazze d'eritema assai pruriginose in varie parti del corpo; tumore splenico; frequenza del respiro e del polso.

Altri 9-10 casi di questa malattia furono descritti in europei residenti nelle regioni africane infette o reduci da esse.

Nel 1903 il Castellani ha descritto nella malattia del sonno, che attacca più specialmente i negri, un tripanosoma nel liquido cerebro-spinale. Questo tripanosoma, detto pure *ugandense*, perchè trovato nell'Uganda, si può trovare anche nel sangue degli stessi malati. Si è visto poi che la malattia di Dutton non è altro che il primo stadio della malattia del sonno. Le differenze morfologiche fra i due tripanosomi non hanno quindi valore differenziale, l'azione patogena nei mammiferi è identica; l'immunità conferita alle scimmie con l'inoculazione di uno si mantiene per l'inoculazione dell'altro. Quindi non c'è più dubbio sull'identità dei due tripanosomi.

La *tripanosomiasi umana* è endemica nei luoghi umidi e boschivi dei bacini dei fiumi Senegal, Niger, Congo e Nilo superiore; predilige fra i negri l'età infantile e giovane e la classe più povera e denutrita. Raramente attacca europei.

Il periodo d'incubazione è lungo. La malattia comincia in modo insidioso. Nella prima fase, che può durare più anni, i tripanosomi vivon già nel sangue, ma in poco numero, e non provocano nei negri alcuna reazione; negli europei dànno la malattia di Dutton. Nella seconda fase, che dura 4-8 mesi, i tripanosomi invadono il liquido cerebro-spinale e allora appaiono i fenomeni nervosi (cefalea, rachialgia, tremori, sonnolenza). Sin dal primo periodo si ha la tumefazione delle glandole linfatiche del collo e delle ascelle; e nel rispettivo tessuto linfatico si trovano tripanosomi. Nella terza fase la febbre diventa etica o si ha ipotermia; alla sonnolenza succede il coma; si posson avere complicazioni da streptococco e pneumococco. La diagnosi si fa coll'esame del sangue o del succo ghiandolare linfatico o del liquido cerebro-spinale. La chinina è inefficace: pare che giovino l'atoxil e il tartaro emetico.

La cosidetta malattia del sonno è dunque anzitutto una poliadenite specifica, prodotta dal tripanosoma gambiense. Si ha, inoltre, in tutti gli stadî della malattia una linfocitosi. I fenomeni generali (stupore, sonno) rappresentano gli ultimi stadî della malattia e precedono, immancabilmente, la morte; pochi giorni prima si può avere un'infezione secondaria da cocchi.

Il tripanosoma gambiense è inoculabile a molti mammiferi e nelle scimmie produce una malattia simile a quella dell'uomo.

Morfologicamente si distingue male dagli altri tripanosomi dei mammiferi (Tav. IV, fig. 6, 7, e fig. 428). È lungo (compreso il flagello) 17-23 μ; largo 2 a 2.8 μ.

Differisce dal *Brucei* anche per la lunghezza del flagello e il più scarso numero di granuli cromatici nel protoplasma; con la colorazione doppia si osserva il macronucleo nel mezzo del corpo; il polo acuto contiene il micronucleo da cui parte il filamento di cromatina che va lungo la membrana e termina nel flagello.



Fig. 428. — *Trypanosoma gambiense.*

La malattia è propagata dalla puntura della *Glossina palpalis* e *fusca* (v. pag. 1104) e di altre dello stesso genere. Ciò fu dimostrato sperimentalmente nelle scimmie, oltrechè la distribuzione geografica dei nominati insetti e della malattia del sonno coincidono. Per questa malattia dunque le mosche succhiatrici di sangue hanno la stessa importanza che le zecche per la piroplasmosi e le zanzare per la malaria degli uccelli e dell'uomo.

È da notare che maschio e femmina di glossine possono essere infetti, e quindi possono infettare.

Non è escluso che i germi della malattia del sonno possano conservarsi in natura, anche nel sangue di animali clinicamente refrattari. Le glossine li propagherebbero fra di essi e manterrebbero così l'infezione dove manca o è rara la presenza dell'uomo.

La moltiplicazione del tripanosoma gambiense nel canale alimentare della glossina palpale fu studiata sperimentalmente.

Si osserva già dopo 24 ore, e ancora dopo 96-120 ore dalla puntura continua una grande moltiplicazione dei tripanosomi entro il canale intestinale; certe volte può continuare anche per 12 giorni; eziandio nelle glossine catturate in luoghi infetti si può vedere la stessa moltiplicazione. Si osservano forme sessualmente differenziate, forme grandi con parecchi nuclei, ecc.

Notisi però che inoculando il contenuto intestinale, con tripanosomi, ad animali suscettivi non si riproduce la malattia. Nelle mosche infette però dentro le ghiandole salivari e nella proboscide vennero riscontrate forme tipiche di tripanosomi.

È perciò ancora discussa da molti la questione se le glossine rappresentino veramente un ospite dove il tripanosoma compia un ciclo di vita, oppure soltanto un semplice veicolo del virus.

La profilassi deve esser diretta contro la glossina e le sue punture.

Probabilmente, durante i primi stadî della malattia, può l'uomo acquistare un'immunità. L'arsenico forse in questo periodo tende ad aumentare l'immunità naturale.

***

Prima del Dutton, nell'uomo il Nepveu aveva segnalati, sin dal 1888, 6 casi di tripanosomiasi nell'Algeria (5 in persone contemporaneamente affette da malaria, 1 in un individuo apparentemente sano), senza però darne una descrizione precisa. E d'allora in poi nessun altro li ha più ritrovati nell'Algeria.

Un nuovo parassita microscopico, fusiforme, allungato come un tripanosoma, senza però membrana e senza flagello, fu scoperto dai fratelli Sergent nell'Algeria. Per le dimensioni si avvicina ai tripanosomi; ma oltrechè manca di flagello e di qualsiasi appendice, nel terzo medio del corpo presenta un nucleo voluminoso e allungato. Nel caso osservato appariva nel sangue periferico di giorno, e scompariva di notte; contemporaneamente alla sua comparsa nel sangue periferico si aveano brividi, freddo, con malessere e nausee, che la notte si risolvevano in sudori.

Recenti studi del Ross e altri dimostrarono che in una forte percentuale di zanzare si riscontrano alcuni flagellati molto simili ai tripanosomi. Questi fatti gettano un'ombra di dubbio su quanto Schaudinn asserisce della parentela fra emosporidî e tripanosomi (pag. 1192), in quanto che si potrebbe sospettare che quelle forme, interpretate da questo autore come stadî di vita degli ematozoi della civetta, non fossero altro che ospiti abituali delle zanzare. D'altra parte alcuni osservatori avrebbero confermato le osservazioni e le interpretazioni dello Schaudinn.

Spirochete.

Sono forme disposte a spirale, con membrana ondulante, senza flagelli, con nucleo filiforme, allungato lungo l'asse del corpo, con parecchi granuli di cromatina. Non si colorano col metodo di Gram. Si moltiplicano per divisione longitudinale, e, secondo alcuni autori, trasversale.

Secondo Borrel e Zettnow alcune sarebbero provviste di ciglia.

A noi più interessano quelle patogene per l'uomo.

Spirochaeta Obermeieri.

È causa della *febbre e tifo ricorrente*, in cui, durante i periodi febbrili, fu trovata nel sangue dall'Obermeier.

Trattasi di filamenti lunghi da 2 fino a parecchie volte un globulo rosso, con 10-20 curvature, talora semplicemente con 2-3 (Tav. IV, fig. 14). Si muovono a spire in avanti o indietro.

È verosimile che vivano in qualche insetto succhiatore di sangue, con la puntura del quale si propaghi la malattia. Schaudinn ne avrebbe osservato la moltiplicazione nella cimice.

Inoculato nelle scimmie il sangue contenente spirochete riproduce una malattia simile a quella dell' uomo. Le spirochete dalle scimmie si possono inoculare con successo nel topo bianco, e la infezione è poi trasmissibile da topo a topo.

***

Nella valle dello Zambese, del Congo, in Abissinia e in altre parti dell'Africa equatoriale è molto diffusa la *febbre da zecche*, caratterizzata da prurito e dolore locale che si irraggia dal luogo della puntura, ed è seguito da vomito violento, diarrea e febbre, che può anche svolgersi come nel tifo ricorrente. Rare volte si ha pure la morte. Può colpire anche gli europei.

Nel sangue dei malati Ross e Milne trovarono delle spirochete simili in tutto a quella di Obermeier. Le scimmie e i topi e i ratti sono recettivi alla infezione sperimentale.

In natura è propagata dall'*Ornithodorus moubata* (v. pag. 1085). Questa zecca che trasmette ereditariamente l'infezione può pungere e infettare anche la scimmia.

Eziandio la febbre da zecche dell'Uganda, secondo Ph. Ross e Milne, e dell'Africa tedesca, secondo Koch, è prodotta dalle stesse spirochete, ed è pure trasmessa dall'ornitodoro suddetto. Koch ha visto le spirochete accumulate attorno e alcune anche dentro le uova, onde la trasmissione ereditaria.

Cosi pure nella Cina si sarebbe osservata una febbre da spirochete, inoculata forse con punture di un acaro.

Anche nell'America si ha una febbre ricorrente dell'uomo, causata da spirocheti, studiate da Carlisle.

Le tre varietà, Europea, Africana, Americana, si possono distinguere mercè reazioni immunitarie (agglutinazione, spirochetolisi per mezzo di sieri specifici, reazione di Bordet Gengou).

***

Altre spirochete vennero finora trovate nell'uomo. Oltre alla *Sp. refringens* (Tav. IV, figure 15 e 17), che si rinviene nei condilomi acuminati e nei condilomi piatti insieme al treponema pallido, citiamo una spirochete nella balanopostite erosiva, un'altra nell'*angina Vincenti* (angina a spirilli del Vincent). un'altra nei carcinomi ulcerati, un' altra in una dissenteria cosidetta spirillare da Le Dantec e così via. Tutte queste spirochete non hanno flagelli; esse poi, sempre mostrano evidente una membrana ondulante.

La *Spirochaeta plicatilis* vive nelle acque stagnanti.

La *Spirochaeta buccalis, s. dentium* è la più piccola finora conosciuta.

Schaudinn suppose che anche il parassita della *febbre gialla*, finora cercato invano con tanti metodi, sia da rintracciare fra simili esseri.

***

Anche nei bovini della Rhodesia il Theiler ha descritto spirochete nel sangue; così pure Martoglio e Carpano nelle pecore di Abissinia.

È nota poi una simile infezione nelle oche (*Spirochaeta anserina*, Sakharoff) e nei polli (*Spirochaeta gallinarum*, Marchoux e Salimbeni); quest'ultima trasmessa dall'*Argas miniatus* (v. pag. 1083).

Siccome in certi casi (pecore, bovini) si è trovata insieme anche una piroplasmosi, è venuto il dubbio di un rapporto genetico fra piroplasmi e spirochete.

Treponemi.

Si differenziano, secondo Schaudinn, dalle spirochete perchè hanno stabile e preformata la disposizione a spirale e, oltre al maggior numero di spire, possedono flagelli, uno a ciascuna estremità. Non hanno membrana ondulante. Si moltiplicano mediante divisione longitudinale, il cui primo stadio si rivela con la duplicità d'un flagello ad una delle estremità.

Secondo Schaudinn e Prowazek anche i treponemi farebbero parte del ciclo a generazione alternante di altri protozoi.

Si conosce nell'uomo il *Treponema pallidum* e il *Treponema pallidulum*.

Treponema pallidum.

Fra i vari germi incolpati di essere causa della sifilide varie volte si era pensato a forme a spirale. Nel 1837 Alfredo Donné aveva ritenuto fattore etiologico della sifilide una forma spirillare che fu detto *Vibrio lineola* e che probabilmente è identico alla *Spirochaeta refringens* a cui accennammo più sopra; più tardi però lo stesso autore trovò questa spirocheta in ulcerazioni non specifiche della vulva e del glande e anche in un caso di cancrena di ospedale.

Nel 1902 Bordet e Gengou dimostrarono uno spirillo in un sifiloma iniziale e in una papula mucosa; due anni dopo Metschnikoff e Roux emetevano il sospetto che causa della sifilide potessero essere degli spirilli.

Nell'aprile del 1905 Schaudinn e Hoffmann pubblicarono una serie di ricerche sui prodotti morbosi sifilitici, iniziali e secondari, e descrissero col nome di *Spirochaeta pallida* un protozoo che costantemente essi trovarono sia nelle manifestazioni esterne, sia nel succo delle ghiandole inguinali ipersplastiche e a cui Schaudinn stesso diede poi il nome *Treponema pallidum*. Questo treponema, nelle manifestazioni esterne si trova insieme con schizomiceti diversi e spesso con la suddetta forma di *Spirochaete refringens* (Tav. IV, fig. 15). Esso (Tav. IV, figure 15 e 16) si presenta come un sot-

tile filamento, lungo da 4 a 14 μ, largo al massimo $^1/_4$ di μ, conformato a guisa di cavaturaccioli, con un numero di spire variante da 10 a 26: le spire sono molto strette e regolari, al contrario di quanto si osserva nelle spirochete e in ispecie in quella *refringens* (Tav. IV, fig. 17), in cui le spire appaiono molto rilassate e irregolari. Esaminato a fresco, appare dotato di movimenti rotatori, di progressione e regressione, distensione e retrazione. Ha due flagelli, uno ad ogni estremità. A fresco si vede molto difficilmente; nei preparati colorati assume debolmente il colore di anilina. In poco tempo le ricerche che confermano il reperto di Schaudinn e Hoffmann si sono moltiplicate.

Assai di rado venne osservato nelle manifestazioni terziarie.

Della massima importanza per quanto riguarda il valore etiologico del trepomena pallido sono: la sua presenza costante nei prodotti sifilitici primari e secondari dell'uomo e della scimmia; l'essersi ritrovato nel contenuto delle vescicole di pemfigo e negli organi più colpiti dei neonati affetti da sifilide ereditaria (Buschke e Fischer, Levaditi, Hoffmann, De Pascalis, ecc.), come pure nell'interno della milza di individui affetti da sifilide costituzionale (Schaudinn) e nel sangue circolante di un paziente con lue secondaria non trattata (Noeggerath e Staehlin). Però non il sangue, ma gli epiteli ghiandolari preferisce per moltiplicarvisi.

In quanto ai metodi di ricerca basti ricordare che si deve prelevare il materiale con le maggiori cure asettiche; si può osservarlo a fresco in campo oscuro mercè condensatore a specchi, paraboloide, ecc. (vedi *Microscopia*, pag. 806) oppure distenderlo sul vetrino e colorarlo o col metodo di Giemsa, prolungando alquanto l'azione della sostanza colorante, o col metodo Marino, o con soluzioni di Nilblau o Capriblau (Herxheimer e Hübner), oppure anche con violetto di genziana carbolica o fucsina carbolica, meglio se si fa precedere alla colorazione una mordenzatura in soluzione al 2 % di acido fosfomolibdico, come consiglia Reitmann; o anche col metodo di Loeffler per la colorazione della ciglia (vedi *Batteriologia*, parte generale).

È consigliabile anche il metodo di Burri: si mescola il materiale raccolto da prodotti sospetti con inchiostro di Cina, si distende in strato sottile e si fa essiccare: in mezzo al campo nero per la precipitazione dell'inchiostro si vedono i treponemi perfettamente bianchi.

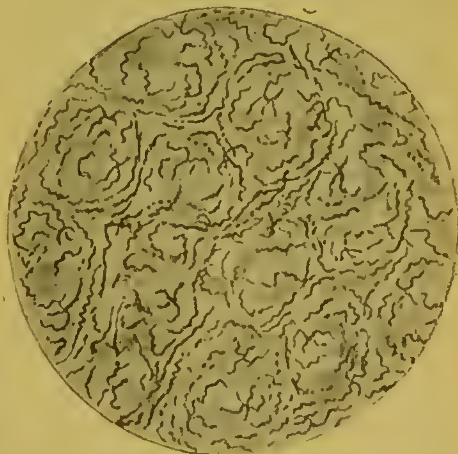


Fig. 429. — *Treponema pallidum*.

Bertarelli e Volpino, Levaditi, ecc. hanno consigliato la impregnazione dei tessuti con $AgNo^3$; i treponemi si colorano in nero, e appaiono evidentissimi e in gran numero nel tessuto colorato in giallo (fig. 429). Ecco come si procede con uno di questi metodi (Levaditi): Piccoli pezzi di tessuto sono fissati in formalina al 10 %. Passaggio in alcool a 96° per 12 ore; lavaggio in H^2O; passaggio per 3-5 giorni (alla temperatura di 37° C.) in soluzione $AgNO^3$ 1.5-3 %; lavaggio in H^2O; passaggio in soluzione di pirogallolo 4 % per

24-48 ore; lavaggio in H^2O; passaggio per la serie degli alcool, xilolo, paraffina e inclusione; tagli al microtomo dello spessore di 5 μ circa.

Mercè la inoculazione di materie prelevate da lesioni sifilitiche nella cornea di conigli e di altri animali di laboratorio e mercè la inoculazione nel tessuto testicolare del coniglio si ottengono lesioni locali (di rado manifestazioni generali) e nei tessuti malati si riscontrano con l'esame microscopico numerosissimi treponemi.

Vari tentativi furono fatti per coltivare il treponema della sifilide: le colture ottenute però erano colture miste di treponemi e di altri microrganismi (Levaditi e Mac Intosch, Scheres, Selwski), oppure anche colture pure (Mühlens), ma l'inoculazione delle colture non riproducendo le lesioni negli animali da laboratorio si dimostrava la perdita di virulenza dei treponemi coltivati.

Più recentemente il Noguchi ha coltivato in coltura pura, in siero di coniglio allungato con acqua (1:3) distribuito in tubi ai quali aggiunge pezzetti di rene o di testicolo di coniglio e in condizioni di stretta anaerobiosi, il *Treponema pallidum*, ottenuto dal testicolo di coniglio sperimentalmente infettato: le colture sono virulenti per il coniglio.

Treponema pallidulum.

È stato trovato dal Castellani in una affezione dei paesi tropicali molto simile alla sifilide, ma da questa diversa seconda l'opinione dei più, detta Framboesia tropicale, Pian, Yaws, ecc. Il *Treponema pallidulum* o *Spirochaeta pertenuis*, è somigliantissimo al *Treponema pallidum*. Il Noguchi lo ha coltivato col suo metodo sopra descritto.

Clamidozoi.

Sotto questa denominazione il Prowazek riunisce alcuni virus, dei quali parecchi sono stati dimostrati filtrabili, e che sono capaci di dare alcune alterazioni cellulari facilmente riconoscibili al microscopio, specifiche della malattia causata dal virus stesso. Il quale, sotto forma di piccolissimi corpiccioli, penetrerebbe nella cellula, ed ecciterebbe questa alla produzione di una sostanza che viene a formarsi intorno ai corpiccioli e a rinchiuderli quasi in una *clamide* (d'onde il nome di clamidozoi). I corpi di Guarnieri nel vaccino e nel vaiolo, quelli di Negri nella rabbia, quelli di Prowazek nel tracoma, quelli di Mallory nella scarlattina, quelli di Schiff nella peste aviaria, quelli di Lentz nel cimurro dei cani, ecc., non sarebbero che il prodotto di una reazione delle cellule alla invasione dei clamidozoi. Per alcune speciali proprietà, specialmente per la poca resistenza ad alcuni fattori fisici e chimici, il Prowazek ritiene che questi virus appartengano piuttosto al regno animale che al vegetale.

Ad ogni modo i corpi descritti dal Guarnieri, dal Negri, ecc., qualunque sia il loro significato, di parassiti oppure di prodotti di reazione contenenti i piccolissimi parassiti, hanno, per la loro specificità, una grande importanza diagnostica.

Vaccino e vaiuolo.

Fin dal 1892 il Guarnieri coltivando la linfa vaccinica nella cornea del coniglio ebbe a notare un fenomeno assai caratteristico, cioè 60-70 ore dopo dell'innesto un'eruzione di puntolini migliari, e poi una piccola ulcerazione irregolare a bordi frastagliati. La cornea attorno si opaca; raramente si ha ipopion. Presto però la necrosi epiteliale suddetta si arresta e si ha la riparazione del processo con la formazione di leucoma.

All'esame microscopico (fig. 430, parte superiore e media) dentro le cellule epiteliali di fianco al nucleo si vedono corpuscoli in varie fasi di sviluppo, che furono dall'A. interpretati come parassiti endocellulari del vaccino e chiamati perciò *Cytorhyctes vaccinae*.

Il Guarnieri, continuando gli studi sulla struttura e sullo sviluppo di questi corpuscoli, ha indicato in essi un citoplasma granuloso, con un nucleo vescicolare provvisto di un cariosoma, ovvero con un grosso granulo, rotondeggiante od ovoide, di cromatina, che tiene luogo del nucleo vescicolare.

Egli descrisse anche (fig. 430, parte inferiore) una moltiplicazione e divisione della cromatina, cioè una moltiplicazione nucleare per un processo di divisione diretta; e anche per un tal modo di riproduzione ritenne si trattasse di sporozoi.

Gli studi del Guarnieri ebbero parecchie conferme, tra le quali citerò quelle del Monti e del Wasilewski, che dopo lunghe ricerche conclude essere la più probabile la teoria che i detti corpuscoli siano gli agenti patogeni del vaccino.



Fig. 430. — Corpi del Guarnierl.

Altri però hanno obbiettato che siano invece inclusioni cellulari derivanti da vari stimoli chimico-fisici sulla cornea. Ma la loro specificità anatomica è indiscutibile.

Secondo Foà, Borrel e Prowazek per ritenerli esseri viventi, non darebbero motivi bastevoli nè la struttura nè le loro proprietà biologiche. Mancherebbero cioè la vera struttura nucleare, il movimento ameboide, la fase di riproduzione e la fase cistica. Di più non resisterebbero al disseccamento, all'azione dell'acqua distillata e delle soluzioni di cloruro di sodio, mentre tuttavia il virus corneale vaccinico conserverebbe in queste condizioni la propria attività.

Il Siegel ha descritto, ma non venne confermato, uno stadio di ulte·

riore sviluppo nelle cellule del rene, analogamente a quanto avviene pei microsporidi.

Il Gorini ha utilizzata la reazione corneale del Guarnieri per fare il controllo del vaccino, ammettendone la purezza e la genuinità, quando, insieme coi suddescritti fenomeni locali caratteristici, non si ha ipopion nelle prime 24-48 ore dell'innesto.

Corpuscoli endocellulari perfettamente analoghi a quelli del vaccino furono dal Guarnieri descritti sulla cornea del coniglio, coltivandovi linfa vaiuolosa: si avrebbe quindi anche un *Cytorhyctes variolae*.

È infine da notare che Piana e Galli-Valerio arrivarono agli stessi risultati del Guarnieri con l'innesto del contenuto delle pustole del vaiuolo del cavallo (*Horse-pox* e *Small-pox*) nella cornea del coniglio.

Recentemente il Prowazek, colorando con genziana e con dahlia, ha distinto dai corpuscoli del Guarnieri alcuni corpicciòli iniziali allungati, e circondati da un alone chiaro, ovale e che si osservano nel protoplasma e nel nucleo delle cellule colpite e poi anche nei corpuscoli del Guarnieri. Conterrebbero essi il virus del vaccino. Anche il Volpino, osservando in campo oscuro il raschiamento della cornea dopo poco tempo dall'innesto del virus, ha osservato nelle cellule e fra le cellule la presenza di piccolissimi corpicciòli, mobili i quali rappresenterebbero il vero agente etiologico del vaccino.

D'altra parte, secondo Remlinger, Casagrandi, Negri, il vaccino è un virus filtrabile e lo stesso hanno dimostrato per il vaiuolo Casagrandi e Levi Della Vida; quindi non si può escludere che i *Cytorhyctes* contengano i veri parassiti, così piccoli da sfuggire ai nostri ordinari mezzi d'indagine.

Ultimamente il Bonhoff ha annunziato d'aver rinvenuto nel vaccino una spirocheta, ma il Carini ed altri lo hanno negato.

Studi ulteriori dovranno mettere in rapporto queste varie ricerche e stabilire definitivamente la natura della causa del vaccino (v. *Virus filtrabili*).

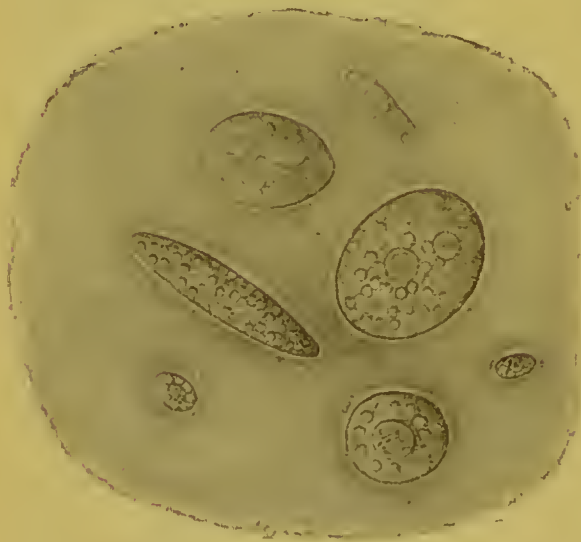


Fig. 431. — Corpi di Negri.

Rabbia.

Da mie ricerche sulla proprietà del virus rabbico, e sulla resistenza sua agli agenti fisico-chimici avevo concluso, fin dal 1887, che il virus rabbico, per la sua poca tenacità, si scostava dai virus batterici allora conosciuti. Di Vestea e altri poi avevano pensato a protozoi.

Nel 1903 A. Negri trovò in modo costante nel sistema nervoso degli animali, che naturalmente o sperimentalmente hanno contratta la infezione rabbica, a fresco (fig. 431) e con adatta colorazione, certi corpi che egli ritenne parassitari dentro le cellule nervose (fig. 432).

Per mettere in evidenza questi corpi, i pezzi si fissano o con sublimato o con liquido di Zenker o con la seguente soluzione di Mann:

Acido picrico	gr.	1.0
Tannino	»	2.0
Soluzione satura di $HgCl^2$ in soluzione fisiologica . .	cmc.	100

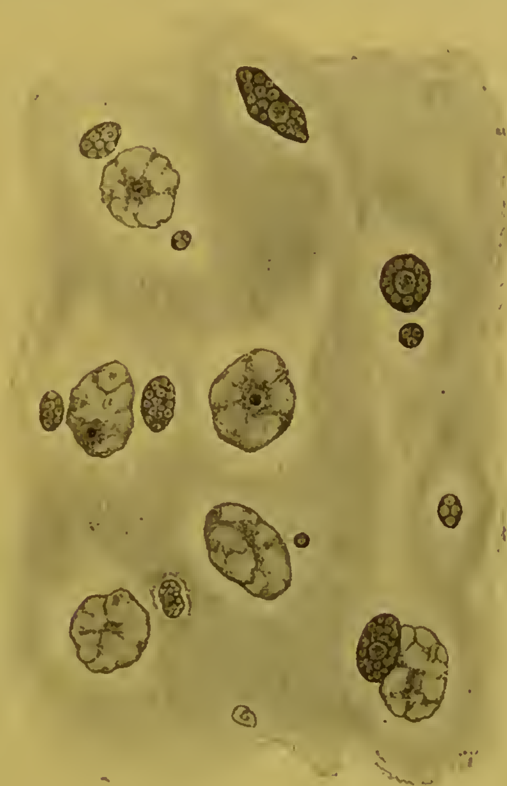


Fig. 432. — Corpi di Negri.

Fatti i soliti passaggi nei vari alcool e in xilolo, inclusi e tagliati i pezzi, si pongono le sezioni a colorare per 24 ore nel seguente liquido:

Soluzione acq. 1 % di turchino di metile (Methylblau, Methylwasserblau)	cmc.	35
Soluzione acq. 1 % di eosina	»	35
Acqua distillata	»	100

Quindi si lavano i preparati in acqua, si disidratano in alcool e si pongono nella soluzione:

Alcool assoluto	cmc.	50
Soluzione di *NaOH* all'1 % in alcool assoluto	gocce	IV

In questa soluzione le sezioni diventano rossastre, quindi si lavano rapidamente in alcool assoluto, poi in acqua, e poi per 2' in acqua leggermente acidulata con acido acetico, nella quale tendono a riprendere il colorito turchino.

Più rapidamente si possono colorare le sezioni per 4'-5' in soluzione acquosa 1 ‰ di eosina *AG*, e poi per pochi secondi in soluzione acquosa 1 % di bleu di metilene.

Si può anche allestire il preparato per schiacciamento con la sostanza grigia del corno d'Ammone, e colorare con uno dei suddetti metodi.

I suddetti corpi hanno dimensioni e forme svariatissime, dalle rotondeggianti e assai piccole (1-5 μ), alle ovali o triangolari, alle ellittiche o piriformi, lunghe 27 μ, larghe 5 μ.

Non c'è dubbio che costituiscono un reperto caratteristico e finora esclusivo della rabbia, tanto che, quando lo si riscontra, può bastare per la diagnosi istologica di questa malattia: però sono assai scarsi nel pavimento del IV ventricolo, dove è notoriamente sempre localizzato il virus rabbico. E sinora non furono trovati nelle glandole salivari del cane e nemmeno nella cornea dopo l'inoculazione del virus rabbico di strada.

Resistono alla putrefazione, in glicerina, al disseccamento, al calore a 45°-50°, e agli acidi minerali. Poco resistono invece agli alcali caustici anche

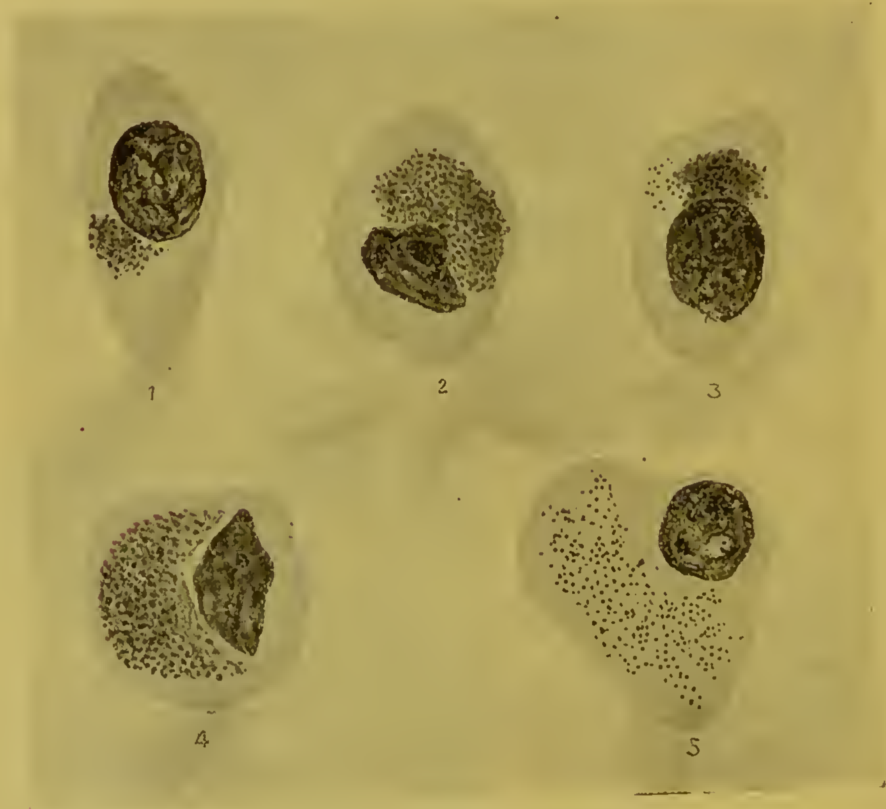


Fig. 433. — Corpi di Prowazek.

in soluzione debole; si comportano dunque in modo differente del virus rabbico verso gli acidi.

Non lasciano vedere forme riproduttive o evolutive di qualsiasi natura per tutto il periodo di incubazione e di durata della rabbia; non si muovono sul tavolino riscaldante; non si riproducono nè si evolvono neanche se mantenuti per alcuni giorni in sacchetti di collodion alla temperatura del

corpo dei conigli. Anzi in tali condizioni degenerano e presentano fasi regressive.

Non hanno dunque le caratteristiche proprietà morfologiche e biologiche per le quali si possano riportare a qualcuno dei protozoi finora conosciuti.

Coi detti corpi si son messe in relazione, senza fondamento però, alcune granulazioni eosinofile che si vedono sparse nel sistema nervoso di animali, non solo arrabbiati, ma anche sani.

I corpi più grossi contengono a lor volta piccoli corpicciuoli che si colorano in turchino, mentre il resto del protoplasma si colora in rosa, e pare indichino un processo di moltiplicazione. Non hanno però struttura certamente nucleare.

Nè si può quindi finora sostenere in modo sicuro che queste formazioni interne dei corpi di Negri siano, come ha supposto il Volpino, i parassiti della rabbia.

Fu del resto messo fuori dubbio colle ricerche di vari autori (Remlinger e Riffat-bey, Di Vestea, Bertarelli e Volpino, Schüder), contemporanee o quasi a quelle mie e di De Blasi, che il virus rabbico è filtrabile.

Tracoma.

Il Prowazek nelle cellule epiteliali della congiuntiva affetta da tracoma, e in quelle di scimmie sperimentalmente infettate con tracoma descrisse alcuni corpi che da lui prendono il nome. Si tratta (fig. 433) di corpi colorabili col metodo di Giemsa in bleu, dapprima piccoli e compatti, poi più grandi e quasi disfatti; nell'interno di essi si scorgono in principio pochi e successivamente più numerosi granulini colorati in rosso. Questi sarebbero gli agenti etiologici del tracoma, e la parte colorata in azzurro rappresenterebbe un prodotto della cellula che reagisce alla presenza del virus tracomatoso, il quale pure sarebbe filtrabile.

(Finito di stampare il 29 gennaio 1912).

VIRUS FILTRABILI [1].

Parecchie malattie dell'uomo e degli animali sono causate da virus i quali hanno la proprietà di attraversare filtri di materia talmente porosa, che trattengono anche i più piccoli batteri finora conosciuti; perciò diconsi *virus filtrabili.*

Altre espressioni usate come sinonimi sono *virus ultramicroscopici* o *submicroscopici* e *virus invisibili*, ma sono meno comprensive. Infatti buon numero di virus filtrabili sono suscettivi dell'osservazione microscopica diretta in campo scuro, quindi non sono assolutamente invisibili; d'altra parte parecchi di essi, ad esempio quelli del vaccino e della rabbia, dànno luogo a formazioni specifiche dimostrabili con l'ordinaria osservazione microscopica, cioè senza speciali espedienti d'illuminazione, e però impropriamente si direbbero ultramicroscopici.

Per bene intendere il concetto di virus filtrabile, giova precisare anzi tutto la condizione essenziale che si richiede perchè il virus di una malattia possa dirsi filtrabile: tale condizione è implicita nell'idea di « virus ». Illustriamola con un esempio generico.

Poniamo di avere il sangue o siero di sangue virulento di un animale colpito da una data infezione; lo filtriamo ed il filtrato, privo di qualsiasi ordinaria forma microbica, inoculiamo in un adatto animale da esperimento. Ammali questo coi sintomi caratteristici della malattia ond'era affetto l'animale che ci ha fornito il sangue virulento, e presenti alla sezione le stesse alterazioni anatomiche conosciute della malattia spontanea.

Se ci arrestiamo a questo punto, non possiamo ancor dire che il virus di quella malattia di cui ci occupiamo sia filtrabile, poichè gli effetti sperimentalmente ottenuti possono imputarsi così ad un « virus », cioè ad un essere vivo e capace di moltiplicarsi, come anche ad un « veleno », cioè ad un semplice prodotto del virus. Ma caviamo del sangue all'animale inoculato, filtriamolo ed iniettiamo il filtrato in un altro animale, e supponiamo che anche questo ammali nel modo caratteristico; prendiamo allora del sangue a questo secondo animale, e, ripetute le medesime operazioni, inoculiamo un terzo animale, e poi ancora un quarto col sangue filtrato del terzo animale, e così via. Se in ogni nuovo animale d'esperimento si riproduce la malattia, allora soltanto possiamo essere sicuri che coi vari filtrati abbiamo ogni volta inoculato l'agente vivo della malattia, non un semplice veleno.

(1) Questo capitolo fu compilato dal prof. De Blasi.

Quindi suol dirsi che *un virus è filtrabile quando il materiale morboso, filtrato* lege artis *ed inoculato in adatti animali d'esperimento, riproduce la malattia in serie.*

La dimostrazione della filtrabilità di un virus è strettamente legata ai mezzi tecnici che si mettono in opera.

Per i filtri e la filtrazione in generale si veda il relativo capitolo in *Batteriologia*; tuttavia, siccome per la dimostrazione dei virus filtrabili occorre usare speciali accorgimenti, riferiamo qui brevemente ciò che vi è di particolare in tale

Tecnica.

1. Scelta dei filtri. — Si raccomanda anzi tutto di usare candele sempre nuove in ogni nuova esperienza, o per lo meno tali che siano state adoperate solo pochissime volte. Siccome non di rado si ha scarso materiale a di-

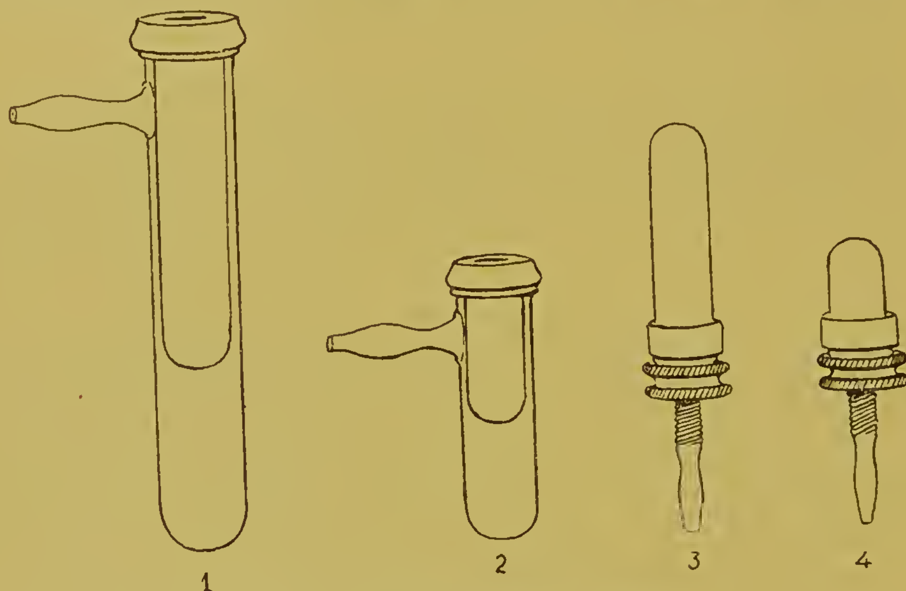


Fig. 434. — Filtri Silberschmidt e Berkefeld.

sposizione, così non sempre si può fare uso di candele grandi, come sono le candele Chamberland, le Berkefeld tipo Chamberland, le Maassen. Si ricorre allora a candele piccole, lunghe un dito od anche qualche centimetro appena: di tali dimensioni trovansi in commercio candele Berkefeld (fig. 434, n. 3 e 4) e Silberschmidt (fig. 434, n. 1 e 2).

Poichè non tutte le candele sono egualmente permeabili, può talora occorrere di usare filtri di vario grado.

Fra le candele Berkefeld si distinguono tre specie, designate con le lettere V (iniziale di *viel* = molto), N (= normale), W (iniziale di *wenig* = poco), delle quali la prima è più permeabile della seconda, questa più della terza. Sono stati anche determinati altri due gradi di permeabilità compresi fra quelli delle V e delle N, e le rispettive candele hanno ricevuto le notazioni V′ e V″.

Di candele Chamberland sono in uso due specie, la F e la B, quella più permeabile di questa. Del resto tali distinzioni sono approssimative. Borrel, per alcune sue esperienze, ha avuto un assortimento di candele Chamberland F, che per la diversa permeabilità loro, poterono essere graduate secondo i numeri 1, 2, 3... 10, in base alla quantità d'acqua che lasciavano passare nell'unità di tempo.

La filtrazione può esser fatta sotto la pressione di 2-3 atmosfere, ovvero per aspirazione: più spesso è stato adoperato il secondo metodo. In ogni modo, bisogna aver cura che la filtrazione si compia rapidamente.

2. Trattamento preliminare del materiale da filtrare. — Di varia natura può essere il materiale da filtrare, secondo le diverse malattie: sangue defibrinato o siero di sangue, latte od altre secrezioni, parenchimi di organi, essudati e trasudati, od altri prodotti morbosi.

Allorchè si ha del materiale solido o semisolido, occorre anzi tutto trasformarlo in una poltiglia finissima ed uniforme. Perciò i parenchimi degli organi, le neoformazioni, ecc., si tagliuzzano e triturano in mortai ben puliti e sterilizzati, le cui pareti non cedano alcuna parte delle sostanze onde son fatte, che potrebbero avere influenza nociva sul virus presente nel materiale. Buoni i mortai d'agata: ottimi i trituratori metallici alla cui azione deve sottoporsi il materiale mescolato con sabbia di quarzo. Durante la triturazione occorre badare che il materiale non si riscaldi; perciò, o si interrompe l'operazione ad intervalli opportuni, ovvero si circonda l'apparecchio di un refrigerante. Le poltiglie così preparate si allungano convenientemente con acqua distillata e si liberano della sabbia di quarzo; i liquidi più o meno torbidi così ottenuti possono senz'altro essere sottoposti alla filtrazione.

Il siero di sangue si può filtrare senza allungarlo, ma allora bisogna ricorrere all'apparecchio Chamberland; più spesso si diluisce, in rapporto variabile da 1:4 a 1:40, ed allora si può filtrare per aspirazione.

Avendo del sangue defibrinato, e volendo ricercare la presenza di un virus nella parte corpuscolata, questa si separa dal siero mediante ripetute centrifugazioni e successivi lavaggi con soluzione fisiologica sterilizzata, indi si scioglie in acqua distillata e si filtra il liquido laccato che ne risulta.

Volendo filtrare del latte, questo prima si centrifuga a lungo per poterne allontanare quella parte di grasso che affiora; poi si filtra successivamente per 2-3 filtri di carta, si allunga con acqua distillata nel rapporto di 1:4-1:10, e la diluzione si filtra per candela.

3. Riconoscimento della sterilità del filtrato. — Per assicurarsi che durante la filtrazione vengono trattenute le comuni forme batteriche, al materiale da filtrare si mescolano a bella posta colture di batteri noti, la cui eventuale presenza si ricerca poi nel filtrato. Si prescelgono a tale scopo batteri piccoli, mobili, cromogeni, o batteri piccoli, che, pure essendo immobili e non cromogeni, possano facilmente e con sicurezza essere dimostrati nel filtrato. Le specie più adoperate sono il *Bacterium pyocyaneum*, agevolmente riconoscibile per la fluorescenza e per la bella colorazione verde che impartisce ai terreni di coltura; il *Bact. prodigiosum*, che dà un vivace pigmento cremisino; più di rado sono stati usati anche dei vibrioni, che formano una pellicola alla superficie del brodo o dell'acqua peptonata, la quale

in tal caso è da preferirsi al brodo. Sicuro ed elegante è anche il controllo fatto con l'aggiunta del *Bact. cholerae gallinarum*, la cui presenza nel filtrato si riconosce inoculando il coniglio, animale suscettibilissimo alla infezione.

Oltre queste prove può riuscire utile allo scopo anche l'osservazione microscopica del filtrato a fresco ed in preparati colorati. Il liquido va prima centrifugato a lungo in una pipetta di vetro, sterilizzata, quale si vede nella fig. 435. Si fa montare il liquido dall'estremità affilata fin verso la strozza-

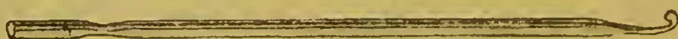


Fig. 435. — Pipetta per centrifugare i filtrati.

tura, poi la punta si chiude alla lampada. Dopo la centrifugazione si rompe la punta e si lasciano cadere le prime due o tre gocce su altrettanti vetrini, per farne subito l'osservazione.

Durante il tempo necessario per riconoscere la sterilità del filtrato, intesa nell'ordinario senso batteriologico della parola, il filtrato stesso si conserva in refrigerante. Una volta assicurata la sterilità, si procede alla inoculazione negli animali, seguendo le vie e le precauzioni che più convengono ad ogni caso. Le esperienze si possono anche iniziare subito, purchè, naturalmente, nel vagliare i risultati, si tenga conto dell'esito delle prove fatte per verificare la sterilità del liquido inoculato.

Virus filtrabili finora conosciuti

sono quelli che producono le seguenti malattie, e li aggruppiamo secondo che fanno ammalare indifferentemente l'uomo e gli animali, oppure soltanto o prevalentemente l'uno o gli altri.

a) Virus comuni all'uomo ed agli animali.

Rabbia. — I risultati positivi della filtrazione di questo virus furono prima annunziati, quasi contemporaneamente, dal Di Vestea in Italia, da Remlinger e Riffat bey all'estero, e poco dopo confermati da altri autori (Bertarelli e Volpino, Celli e De Blasi, Schüder). Il virus contenuto nel sistema nervoso centrale passa per le candele Berkefeld, sia che si filtri sotto pressione di 2 (Di Vestea) o 3 atmosfere (Bertarelli e Volpino), sia che si filtri per aspirazione, cioè sotto una pressione poco meno di un'atmosfera (Celli e De Blasi, Remlinger e Riffat bey, Schüder). Bertarelli ha dimostrato la filtrazione del virus anche usando la saliva di un bambino colpito dalla rabbia. Il virus fisso e quello di strada traversano indifferentemente i filtri. In certe condizioni il virus è passato anche per le candele Berkefeld N e W. La dimostrazione della virulenza del filtrato è stata data nei conigli; nei cani non è stata però mai riprodotta col filtrato la forma furiosa, bensì la consuntiva o marantica del Celli. Nel corno d'Ammone dei conigli inoculati col filtrato Celli e De Blasi trovarono i caratteristici corpi del Negri.

Vaccino. — Quasi contemporaneamente, il Casagrandi sperimentando nel cane, il Negri nel vitello, e tutti e due sulla cornea del coniglio, dimostrarono la filtrabilità del virus vaccinico. Il Casagrandi aveva già prima fatto esperienze di filtrazione, ottenendo risultati importanti rispetto all' immunità antivaccinica.

Il Casagrandi filtrava il vaccino solo per aspirazione, il Negri anche sotto pressione di 3 atmosfere. Il Negri ottenne la riproduzione di pustole caratteristiche, inoculando i filtrati batteriologicamente sterili: il Casagrandi provò che il filtrato ottenuto per qualsiasi tipo di candele, anche le meno permeabili, quali sono le Chamberland B e le Berkefeld W, riproduce sulla cute addominale dei cani papule trasmissibili in serie; e che le papule, solo quando il filtrato proviene dalle Berkefeld V ed N, evolvono in pustole caratteristiche. Carini, Nicolle e Adil bey, Remlinger e Nouri ed altri confermarono la filtrazione del virus. L'iniezione sottocutanea del filtrato conferisce immunità (Casagrandi).

b) Virus propri dell'uomo.

Febbre gialla. — La filtrazione di questo virus fu dimostrata da Reed, Carroll, Lazear ed Agramonte, e confermata poi da Darker, Beyer e Pothier, da Marchoux, Salimbeni e Simond.

È virulento il sangue raccolto nei primi 3 giorni della malattia, ed il rispettivo filtrato attraverso candele Berkefeld o Chamberland F. Nel corpo della *Stegomyia fasciata* (v. p. 1117), che trasmette l'infezione, non è stata rinvenuta alcuna forma parassitaria avente un rapporto etiologico sicuro con la malattia.

Recentemente H. Seidelin ha riferito che nell'emazie dei malati di febbre gialla si rinvengono dei parassiti, affini alle Babesie, ed in alcune loro forme tanto piccoli da spiegare la già prima accertata filtrazione del virus: egli propone il nome di *Paraplasma flavigenum.*

Mollusco contagioso dell'uomo. — M. Juliusberg riprodusse questa malattia distendendo sulla cute umana, fatta prima leggermente sanguinare per mezzo di carta smerigliata, il filtrato della poltiglia dei tumoretti, convenientemente allungata e passata per candele Chamberland. A. Serra ed altri hanno confermato questi risultati.

Verruca infettiva. — Anche questa lenta neoformazione della cute sarebbe causata da un virus filtrabile, secondo le esperienze del Ciuffo.

Dengue. — La febbre *dengue*, malattia esotica sulla cui etiologia esistevano ricerche controverse ed opinioni svariatissime, è data da un virus filtrabile, secondo le ricerche di Ashburn e Craig. Il virus traversa i filtri Berkefeld; la malattia è trasmessa dal *Culex fatigans* (v. p. 1108). secondo le esperienze eseguite dal Graham.

Febbre estiva o dei tre giorni, o da pappataci. — Questa malattia, che può esplodere in forma epidemica, e che è trasmessa dal *Phlebotomus pappatasii*, è prodotta da un virus filtrabile (Doerr nella costa adriatica balcanica, Birt a Creta e a Malta, Napolitani e Tedeschi in Italia).

Tracoma. — Bertarelli e Cecchetto riuscirono a trasmettere l'infezione alla congiuntiva delle scimmie, inoculando il filtrato ottenuto per candele Berkefeld da una sospensione di detriti raschiati dalla congiuntiva umana malata. Nelle cellule dell'epitelio congiuntivale degli individui inoculati col filtrato si ritrovano i corpuscoli di Prowazek.

Orecchioni o parotite epidemica. — Secondo S. Granata, gli orecchioni sono probabilmente causati da un virus filtrabile. Egli potè riprodurre una parotite febbrile nei conigli, iniettando loro sotto cute o nel parenchima ghiandolare il filtrato sterile della saliva di un parotitico. Inoculando il filtrato sulla cornea scarificata, potè anche osservare nell'epitelio inclusioni cellulari simili a quelle del tracoma.

Vaiuolo. — Del virus vaioloso hanno provato la filtrabilità il Casagrandi, e quasi nello stesso tempo il Levi della Vida: nella cornea dei conigli, inoculata col filtrato, si rinvennero i corpuscoli del Guarnieri.

Anche sarebbe filtrabile, secondo Carini, una malattia detta *alestrim*, che occorre nello Stato di San Paulo, ed è caratterizzata da una eruzione pustolosa, col contenuto lattescente, onde il nome di *milk-pox* dato dal De Korte alla stessa malattia: questa è diffusa nell'Africa del Sud, dove riceve il nome di *amaas*.

Poliomielite acuta infettiva. — Contemporaneamente Landsteiner e Levaditi in Europa, Flexner e Lewis in America, dimostrarono la filtrabilità del virus: essi inocularono con buon successo, in diverse specie di scimmie, i filtrati di poltiglie preparate dal midollo spinale di bambini morti per poliomielite. La dimostrazione è stata data anche con esperimenti positivi in alcune razze di conigli (Lenz). Il virus passa per i filtri Berkefeld, Chamberland, Pukall. Esso trovasi altresì nella mucosa naso-faringea, nelle ghiandole linfatiche ed in altri organi; ed anche positive sono riuscite le esperienze di filtrazione fatte con questi materiali.

In una consimile malattia spontanea delle cavie è stata pure dimostrata, dal Römer, la filtrabilità del virus.

Tifo esantematico. — In occasione di una epidemia scoppiata nel 1909 e propagatasi nel 1910 nei possedimenti francesi dell'Africa mediterranea, M. Nicolle, avendo prima accertata la trasmissione della malattia ad alcune specie di scimmie, principalmente al *Macacus sinicus*, ha poi dimostrato che la malattia si manifesta anche per l'inoculazione del filtrato, batteriologicamente sterile, del siero di sangue di uomini malati. M. Nicolle ha raccolto inoltre molti fatti, dai quali risulterebbe la malattia essere trasmessa per i pidocchi.

Scarlattina. — Cantacuzène, poi Bernhardt, e Landsteiner, Levaditi e Prasek riuscirono a trasmettere la scarlattina alle scimmie inferiori inoculando sotto cute, o nella mucosa orale, sia la raschiatura della lingua degli scarlattinosi, sia l'emulsione di tessuto tonsillare; il primo autore vi riuscì anche inoculando sangue di scarlattinosi. Gli autori hanno

dimostrato che lo stesso materiale, filtrato per candele Berkefeld, riproduce ugualmente la malattia.

Morbillo. — Goldberger e Anderson, dopo avere stabilito che questa malattia esantematica è trasmissibile ad alcune specie di scimmie, e che il virus trovasi nel sangue dei malati nel periodo preeruttivo e 24 ore dopo l'eruzione, riprodussero la malattia sul *Macacus rhesus*, anche inoculando il filtrato, ottenuto attraverso candele Berkefeld, del siero di sangue virulento di morbillosi. Anche quello del morbillo è dunque un virus filtrabile.

c) Virus propri degli animali.

Afta epizootica. — Il virus di questa malattia è cronologicamente il primo che fu riconosciuto filtrabile, nel 1898, da Löffler e Frosch. Il filtrato della linfa aftosa diluita 1:40 e passata per candele Berkefeld, inoculato anche in piccolissima quantità nei vitelli e nei maiali, per via intravenosa, riproduce la classica malattia in serie. Il virus attraversa anche i filtri Chamberland, non però quelli Kitasato.

Peripneumonite dei bovini. — Il virus di questa malattia, presente nell'essudato pleurico e nell'edema sottocutaneo dei bovini malati, fu riconosciuto filtrabile da Roux e Nocard. Questo virus però passa soltanto attraverso candele molto permeabili, quali sono le Berkefeld e le Chamberland F, purchè il liquido sieroso sia diluito 20-30 volte. Inoltre è stato possibile di farne l'osservazione microscopica ordinaria, che fa vedere elementi piccolissimi rotondeggianti, dotati di vivacissimi movimenti di oscillazione, e colorabili; se ne sono ottenute anche delle colture artificiali, prima in sacchetti di collodio, posti nella cavità addominale del coniglio, e poi anche nel brodo Martin, contenente alquanto siero di sangue bovino. Rigorosamente parlando quindi, è un virus filtrabile che ricorda molto le forme batteriche piccolissime.

Peste equina. — Il siero di sangue dei cavalli malati di questa malattia nella Colonia del Capo, filtrato per candele Chamberland B, purchè prima sia diluito nel rapporto 1:50, riproduce la malattia negli animali sani (Mc Fadyean). Poichè questa malattia contraggono i cavalli che pernottano all'aperto, non quelli nelle stalle, si è pensato che essa venga propagata per la puntura di qualche artropodo con abitudini notturne.

Peste aviaria, o tifo essudativo dei gallinacei. — Centanni prima, poi Maggiora e Valenti, inoculando nei polli e nei conigli minime quantità del filtrato ottenuto, per candele Chamberland F o Berkefeld, dal sangue di polli malati, riprodussero la malattia. Lode e Gruber, Ostertag e Wolffhügel, Eggebrecht ed altri confermarono tali risultati. Marcone dimostrò la stessa cosa nella peste dei fagiani, Stazzi in quella di alcuni pappagalli.

Maggiora e Valenti dimostrarono la filtrabilità del virus anche in un'affezione simile, ma non identica, di varie specie del genere *Turdus*.

Peste bovina. — Il virus di questa malattia epizootica fu dimostrato filtrabile per candele Berkefeld da Nicolle e Adil bey, e poi da parecchi

altri autori, fra cui Memmo, Martoglio e Adani nella Colonia Eritrea. Il filtrato virulento, ottenuto dal siero di sangue, e riscaldato a temperatura di 60° per un'ora, conferisce immunità ai bovini, i quali possono, dopo ripetute iniezioni, fornire un siero immunizzante specifico. Di questo si fa uso per impedire od attenuare i pericoli della pura vaccinazione antipestosa, inoculandolo insieme col vaccino nei bovini da proteggere: la sierovaccinazione si pratica in Eritrea e nei territori limitrofi con buon successo.

Epitelioma contagioso o vaiuolo dei volatili. — Marx e Sticker hanno riprodotto questa malattia sulla cresta e sui bargigli di polli sani, scarificandone l'epitelio ed inoculando il filtrato ottenuto per candele Berkefeld dalla poltiglia allungata dei tumori spontanei. Gli stessi autori, come anche Juliusberg ed altri, hanno dimostrato che è filtrabile pure il virus dell'epitelioma contagiòso dei piccioni.

Vaiolo ovino (vulgo *schiavina*). — Borrel ha trovato che le pustole contengono un virus filtrabile, capace di trasmettere la malattia in serie agli animali sani.

E. Chaumier ha ottenuto pustole vacciniche nel vitello inoculando il virus del vaiolo ovino.

Agalassia contagiosa delle pecore e delle capre. — Celli e De Blasi diedero la dimostrazione della filtrabilità di questo virus, iniettando sotto cute, o anche semplicemente introducendo nel condotto galattoforo della mammella di pecore sane, il filtrato di latte virulento raccolto nei primissimi giorni di malattia. Con l'inoculazione nella mammella si son riprodotte, oltre che la mastite con la perdita del latte, anche le caratte-stiche lesioni articolari ed oculari. Il filtrato virulento, riscaldato un quarto d'ora a 45°-50° C., conferisce immunità.

Anemia contagiosa degli equini, o tifoanemia. — È una malattia che è stata studiata principalmente nell'Alsazia. Vallée e Carré dimostrarono per primi la infettività del siero di sangue e la filtrabilità del virus attraverso candele Berkefeld V, Chamberland F e B; Hempel in Germania ha confermato questi risultati.

Colera dei suini. — È stato riconosciuto filtrabile il virus di questa infezione in America da de Schweinitz e Dorset, da Dorset, Bolton e Mc Bryde, da Mc Clintock, Boxmeyer e Siffert; in Germania da Ostertag e Stadie, da Uhlenhut, Xylander, Hübner e Bohtz; in Italia da Ottolenghi e da Stazzi. Il virus trovasi nel sangue raccolto durante i primissimi giorni di malattia. Il *Bact. suipestifer*, già prima considerato come causa specifica della malattia, non rappresenta che un agente accessorio.

Petrie e O'Brien osservarono fra le cavie un'epizoozia, prodotta da un virus filtrabile attraverso candele Berkefeld, nella quale si trovò associato un germe simile al *Bact. suipestifer.*

Cimurro dei cani. — Questa malattia, che si credeva causata da un bacillo assai piccolo e simile al bacillo del colera dei polli, va annoverata fra quelle da virus filtrabili, secondo le esperienze di Carré, il quale

l'ha riprodotta inoculando in cani sani il filtrato sterile dello scolo nasale dei cani affetti da cimurro. Il Lignières confermò i risultati del Carré, precisando che il virus traversa i filtri Berkefeld.

Febbre catarrale della pecora o « *lingua azzurra* ». — La filtrabilità del virus di questa malattia, che è diffusa nei possedimenti inglesi dell'Africa del Sud, è stata data da Theiler e Robertson, i quali fecero passare per candele Berkefeld il siero di sangue di animali spontaneamente malati, e col filtrato riprodussero la malattia negli animali d'esperimento.

Stomatite papulosa specifica dei bovini. — Ostertag e Bugge hanno studiato questa malattia, che ha somiglianza con la febbre aftosa, ma ne differisce per più caratteri, fra i quali la benignità. Essi hanno dimostrato che si tratta anche qui di un virus filtrabile, che passa attraverso le candele Chamberland.

Anemia infettiva dei cani. — Il Trincas ha studiato questa malattia in Sardegna, dimostrando l'infettività del sangue dei cani malati, e la filtrazione del virus.

Difterite aviaria. — Anche questa malattia, tanto nei polli, secondo Carnwath ed altri, quanto nei piccioni, secondo Dean e Marshall ed altri, è data da un virus filtrabile, che sarebbe identico a quello dell'epitelioma contagioso, potendosi riprodurre questa alterazione col filtrato virulento di materiale difterico, e viceversa la difterite col filtrato dell'epitelioma. Tale asserzione appartiene a Carnwath, ed è stata confermata da Uhlenhut e Manteufel e da altri.

Leucemia dei polli. — È questa una malattia epizootica, che fu descritta da Ellermann e Bang, i quali, riconosciutane la natura infettiva, poterono riprodurla una volta anche inoculando il filtrato sterile di poltiglia di organi tolti da polli spontaneamente ammalati. Mancano esperienze di trasmissione in serie coi filtrati.

Proprietà comuni ad alcuni virus filtrabili.

1. Osservazione microscopica ed ultramicroscopica. — Abbiamo detto che per alcuni virus si conoscono delle formazioni speciali, quasi tutte intracellulari, che furono aggruppate dal Prowazek sotto il nome di clamidozoi, e della cui interpretazione si è già discorso a pag. 1200.

Certo non queste sono le forme che passano attraverso i filtri; ma non v'è dubbio che la virulenza dimostrata dai filtrati dipenda da elementi biologicamente individuati, e non da un semplice *contagium vivum fluidum*, come, per esempio, il Beijerinck ammise per il virus che causa la malattia delle foglie del tabacco nota col nome di « mosaico ». In favore dell'affermazione della natura figurata dei virus filtrabili sta l'esperienza del Remlinger, il quale, centrifugando a lungo il filtrato di midolli rabbici, ottenne virulenta la parte inferiore del liquido, inattiva la parte superiore; ed ancor più l'osservazione dei protozoi intraglobulari fatta da Seidelin nella febbre gialla.

Del resto l'osservazione diretta di piccolissimi elementi figurati ormai è stata fatta per non pochi virus filtrabili. Lasciamo da parte il virus della peripneumonite bovina, quello della peste aviaria e quello della poliomielite, che per essere coltivabili si possono riconoscere, mediante l'ordinaria osservazione microscopica, anche nelle colture artificiali, sotto forma di elementi rotondeggianti; lasciamo pur da parte quello della peste bovina, e quello dell'afta epizootica, perchè appare incerta l'interpretazione dei corpuscoli osservati nel siero di sangue dei bovini pestosi e nella linfa vescicolare dei bovini aftosi (intendiamo rammentare i corpicciuoli osservati fin dal 1895 da Piana e Fiorentini, che li considerarono come elementi protozoari, e proposero per essi il nome di *Protamoeba aphthogenes*); e consideriamo soltanto quei piccolissimi corpuscoli rotondeggianti, assai mobili, quali si vedono dentro e fra le cellule dell'epitelio corneale di conigli inoculati con vaccino, come anche quelli che si trovano nell'epitelio congiuntivale dei tracomatosi, o delle scimmie sperimentalmente inoculate di tracoma: tali corpuscoli rappresentano probabilmente gli elementi filtrabili del virus. Tali corpuscoli si osservano bene con l'illuminazione in campo scuro (v. *Microscopia*, questo volume, pp. 806-811), e si possono anche colorare, per esempio, col turchino di Löffler. Anche per il virus della rabbia alcuni ammettono che i granuli piccolissimi che stanno dentro i corpi del Negri, e che possono trovarsi altresì isolati, rappresentano gli elementi filtrabili del virus.

2. Coltivazione dei virus filtrabili. — Non si è riusciti finora ad ottenere in colture artificiali la maggior parte dei virus filtrabili, tranne poche eccezioni. Certa è la coltivazione del virus della peripneumonite ottenuta prima da Roux e Nocard, e poi da Dujardin-Beaumetz e da altri; così pure quella del virus della poliomielite, asserita da Flexner e Lewis e da Levaditi, e quella del virus della peste aviaria ottenuta da Marchoux. Il Casagrandi e il Licheri hanno potuto coltivare *in vitro* anche il virus del vaccino. Si può dire che questi sono tentativi ben riusciti, ma non ancora mezzi facili e sicuri di coltivazione artificiale.

3. Trasmissione dei virus filtrabili. — Alcuni virus filtrabili hanno la proprietà di passare dal corpo di un animale all'altro, senza forse attraversare alcun periodo di vita nell'ambiente esterno. Di parecchi di essi è certo che vengono inoculati per mezzo di animali. La rabbia si trasmette per morsicatura da un animale all'altro; la febbre gialla per le punture della *Stegomyia fasciata*; la febbre estiva mediante i pappataci; il dengue per mezzo del *Culex fatigans*; quasi certamente il tifo esantematico per mezzo di pidocchi; e probabilmente la peste equina per un artropodo, forse una zanzara d'abitudini notturne, come fu già supposto dal Finlay ed ammesso da Mc Fadyean. Di alcuni altri virus, benchè non vi sia nulla di assodato, pure si può supporre che si propaghino con simili mezzi.

TABELLA 102. *Resistenza di alcuni virus filtrabili all'azione del calore.*

Virus	40° C.	45° C.	50° C.	55° C.	60° C.	65° C.	70° C.	80° C.
Peripneumonite	conferisce immunità	....	....	....	....	....	....	....
Anemia infettiva dei cavalli	....	....	....	muore dopo un'ora	....	....	....	....
Peste equina	....	attivo dopo 6 giorni	....	....	....	....	....	....
Peste aviaria	....	....	....	inalterato dopo mezz'ora	muore dopo un'ora	muore dopo 5'	muore dopo alcuni istanti	....
Epitelioma contagioso dei polli	...	....	....	....	muore dopo 3 ore	....	....	attivo dopo 30' (allo stato secco)
Mollusco contagioso dell'uomo	....	....	....	....	....	....	muore dopo 10	....
Afta epizootica	....	....	.. .	....	fortemente attenuato dopo 30'	....	muore dopo 30'	....
Peste bovina	....	muore dopo 15-30'		....	....	....	....	....
Vaiolo ovino	....	....	....	muore dopo 3'		....	....	....
Febbre gialla	....	....	....	muore dopo 10'	....	....	....	....
Rabbia	...	muore dopo 12 ore	....	muore dopo un'ora	muore dopo 30'	....	....	....
Vaccino	....	....	....	....	....	....	attivo dopo un'ora	muore dopo un'ora
Poliomielite infettiva	....	muore dopo alcuni minuti		....	....	....	....	....

4. Resistenza dei virus filtrabili. — Con la diversa costituzione protoplasmatica di alcuni virus filtrabili sembra essere connessa la resistenza loro, differente da quella dei comuni batteri conosciuti: verso alcuni agenti fisici, essa non di rado è minore, talora anche maggiore (v. Vol. II, p. 786 e 954).

Per darne un'idea, riproduciamo nella tabella a pagina precedente i vari gradi di resistenza al calore per alcuni virus filtrabili.

Alcuni virus filtrabili dimostrano poi verso certe sostanze chimiche un comportamento contrario a quello dei batteri.

Così nella glicerina, mentre i batteri in generale si attenuano e col tempo periscono, i virus della rabbia, del vaccino, della poliomielite acuta ecc. si conservano intatti per molto tempo. Di tale proprietà si fa profitto per purificare la polpa vaccinica, mescolandola con glicerina; per conservare e spedire il bulbo di cani sospetti idrofobi agli Istituti antirabbici; per mantenere in laboratorio a scopo di studio i virus della peste aviaria e della difterite aviaria, come anche quello della poliomielite, che non facilmente si può ottenere sempre fresco. Così pure resistono all'azione dell'antiformina il virus del vaiuolo dei polli e quello della peste suina, mentre i comuni batteri periscono, ad eccezione del bacillo tubercolare e simili. Analogamente parecchi virus filtrabili sono distrutti dalla bile, mentre i batteri vi si conservano intatti, ed alcuni anzi vi si moltiplicano, tranne lo pneumocco. Osservazioni consimili sono state fatte anche per la saponina e per la tripsina. Per queste proprietà, come del resto anche per altre, alcuni virus filtrabili si accostano certamente ai protozoi, altri ai batteri.

5. Reperti batteriologici in alcune malattie da virus filtrabili. — Alcune malattie, prima che fosse dimostrata la filtrazione del loro virus, si credevano causate da forme batteriche: così la febbre gialla dal *Bact. icteroides* del Sanarelli, il colera dei suini dal *Bact. suipestifer* del Salmon. Oltre questi batteri, altri ne furono trovati, la cui importanza etiologica nelle rispettive malattie fu più o meno contrastata: così lo streptococco di Moser nella scarlattina, i cocchi vari descritti nella poliomielite acuta e nel dengue, quelli dimostrati dall'Oreste nel latte delle pecore malate di agalassia, lo speciale stafilococco che isolarono Sanfelice e Malato dalle pustole e dagli organi dei vaiolosi, il saccaromicete trovato da Sanfelice e da Casagrandi nel vaiuolo dei polli, i bacilli paratifosi o protei isolati in alcuni casi di ittero infettivo, ecc.

I reperti sono indubitabili; ma poichè queste diverse infezioni si possono riprodurre indipendentemente dai relativi germi nominati, bisogna conchiudere che essi non hanno importanza etiologica diretta, senza potere escludere tuttavia che possano in qualche caso forse render più rapida e grave l'azione deleteria dei virus specifici.

(Finito di stampare il 31 gennaio 1912).

D. DE BLASI

BATTERIOLOGIA.

BATTERIOLOGIA.

Nel breve giro di poco più che mezzo secolo la Batteriologia ha avuto così poderoso incremento, non pure nella parte dottrinale ma, e più, nelle sue applicazioni, che ha prodotto già rigogliosi rami speciali di cultura, ai quali singolarmente dedicano la loro operosità moltissimi studiosi. Perciò si può distinguere una Batteriologia teoretica e descrittiva da una Batteriologia applicata, e questa alla sua volta può suddividersi applicata all'Igiene e alla Medicina, all'Agraria, alle Industrie.

Succintamente tratteremo la prima (Batteriologia generale), più largamente la Batteriologia applicata all'Igiene e alla Medicina (Batteriologia speciale).

Si chiamano *batteri*, con nome introdotto da Ehrenberg e poi definito nel suo più ampio significato odierno da F. Cohn, quegli esseri viventi unicellulari piccolissimi, di grandezza oscillante intorno al millesimo di millimetro o micron (μ), di forma esteriore semplicissima, morfologicamente poco differenziati, che tutti si moltiplicano per divisione trasversale diretta ed alcuni si riproducono anche per mezzo di spore. Si conviene di ascriverli al regno vegetale; ed il Nägeli, più precisamente considerandoli come funghi, perchè privi di clorofilla, e tenendo conto del loro moltiplicarsi per diretta scissione, li denominò *schizomiceti*.

Però avvertiamo che alla parola « batteri » suol darsi oggimai un significato, che noi qui accettiamo, più largo di quel che spetti alla parola « schizomiceti »; così che, oltre questi, intesi in senso stretto, si annoverano fra i batteri anche gli attinomiceti o streptotrichee, come anche si chiamano, ed i così detti batteri filamentosi, che vedremo essere, per più caratteri, ben differenziati dagli schizomiceti propriamente detti. Se la maggior parte dei batteri dimostrano affinità coi funghi inferiori, ve n'è tuttavia di quelli

che maggiormente si avvicinano alle alghe, ed altri finalmente che, per alcune proprietà, specie fisiologiche, si accostano ai microscopici esseri animali; onde non farà meraviglia che Haeckel proponesse di comprendere nel nome di « protisti » tutti quei microrganismi della cui natura animale o vegetale si può giudicare con argomenti in parte contrastabili; nè parrà strano che il genere *Spirochaeta*, il quale prima si poneva tra i batteri, dopo ripetute osservazioni e discussioni, per consenso dei più, sia passato fra i protozoi.

Come in tutte le scienze sperimentali, così anche in Batteriologia la tecnica è talmente compenetrata con la parte dottrinale, che bisognerebbe discorrerne promiscuamente; tuttavia crediamo opportuno trattarle ciascuna per sè. Alla parte espositiva delle nozioni di Batteriologia generale facciamo precedere la descrizione dei mezzi tecnici e metodi che servono per dimostrare le proprietà dei batteri e studiarne le molteplici azioni.

TECNICA BATTERIOLOGICA.

Cominciamo con l'osservazione microscopica dei batteri, e poichè la struttura e l'uso del microscopio sono stati spiegati in *Microscopia* (vedi pp. 787-806), così passiamo senz'altro ai

A. — PREPARATI MICROSCOPICI.

L'osservazione microscopica dei batteri può farsi in *preparati a fresco semplici, preparati a goccia pendente* e *preparati colorati.*

I. — OGGETTI OCCORRENTI ED OPERAZIONI GENERALI.

Vetrini. — Per fare dei preparati a fresco semplici o colorati, si usano due sorte di *vetrini*: i *portoggetti*, abbastanza spessi, rettangolari, per lo più delle dimensioni 26 × 76 mm., ed i *coproggetti*, quadrati, con lato di 18 mm., spessi circa 0.16-0.18 mm.

Tanto i vetrini coproggetti quanto i portoggetti devono essere ben puliti, specialmente quando servono per farvi delle colorazioni speciali assai delicate, come p. es. quella delle ciglia batteriche. Per i preparati ordinari, i vetrini nuovi si puliscono in generale passandoli in alcool allungato; anzi in questo sogliono appunto conservarsi, dentro una vaschetta munita di coperchio a chiusura smerigliata. Al momento del bisogno, si estraggono dalla vaschetta, si prendono per il taglio fra i polpastrelli di due dita, e si asciugano strofinandoli dolcemente con una pezzuola di tela.

Se i vetrini sono già stati usati, per pulirli s'immergono in acido solforico grezzo, si lavano poi con acqua spesso rinnovata, si fanno bollire in una soluzione forte di potassa, si rilavano in acqua, ed infine si passano in una

miscela a parti eguali di alcool ed etere, oppure in benzina o in xilolo; dopo di che si asciugano. La conservazione si fa sempre in alcool allungato.

Quando si richiede una pulizia perfettissima, come accade appunto nella colorazione della ciglia, si ricorre a vari metodi, che naturalmente si applicano ai vetrini nuovi.

Eccone uno, che è del Cerrito.

Si fanno bollire per 10′ in soluzione di potassa al 10 %, poi si lavano con acqua comune, e per 15′ ancora con una soluzione di acido cloridrico al 10 %; si rilavano con acqua distillata, da ultimo si asciugano con una pezzuola di tela grossolana.

Ecco un altro metodo, che è di Zettnow.

Si fanno bollire per 10′ in una soluzione al 10 % di bicromato di potassio ed acido solforico grezzo, poi si lavano in liscivia sodica allungata per 5′; si fanno ribollire per 5′ nella soluzione di bicromato ed acido solforico; da ultimo si lavano con acqua e con alcool, e si asciugano.

Per fare preparati a goccia pendente servono dei portoggetti speciali, aventi nel mezzo una escavazione a calotta, che diconsi *vetrini da goccia pendente* o *vetrini di Koch* (fig. 436). Per lo stesso scopo si possono usare por-

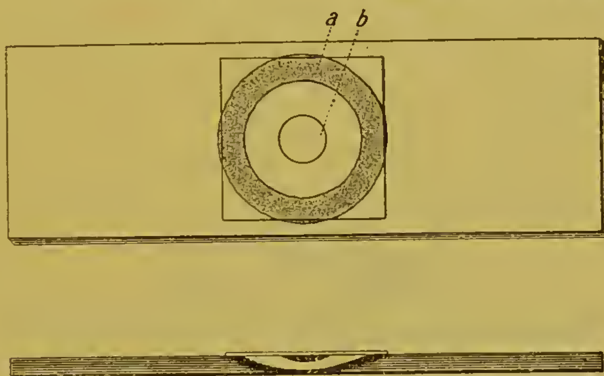


Fig. 436. — Vetrino di Koch per goccia pendente, visto di faccia e di taglio. *a* cerchio della vaselina; *b* goccia batterifera.

toggetti con celletta cilindrica, dal cui fondo s'inalza un basso disco, a guisa di plinto, che resta quindi circondato da un solco anulare, ed ha la faccia superiore più bassa di quella del portoggetti: *vetrini di Ranvier* (fig. 437).

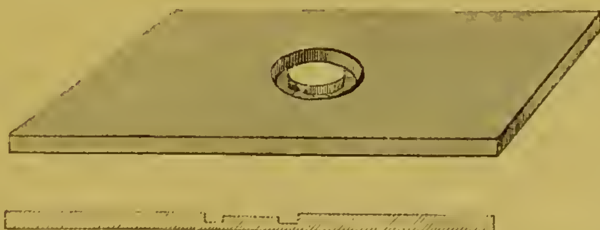


Fig. 437. — Vetrino di Ranvier, visto di faccia e di taglio.

Vi sono ancora vetrini simili a quelli di Ranvier, salvo che il solco, in un punto del suo giro, si continua con una specie di doccia, fatta a bec-

cuccio, ed inclinata in modo che, restringendosi via via, termina con l'apice sul piano del vetrino: questi, che diconsi *vetrini di Prazmowski* (fig. 438), servono per l'osservazione dei movimenti degli anaerobi.

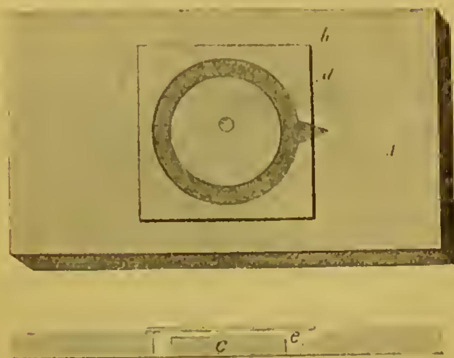


Fig. 438. — Vetrino di Prazmowski, visto di faccia e di taglio.

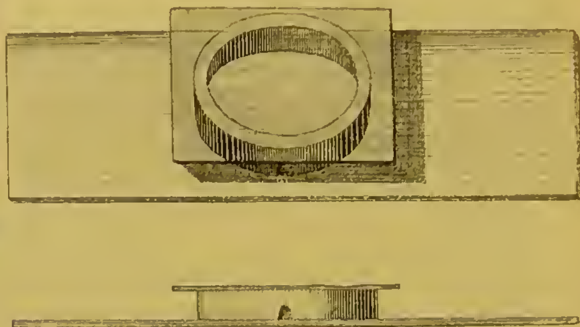


Fig. 439. — Camera di Böttcher, vista di faccia e di lato.

Allo stesso scopo sono state adoperate anche le così dette *camere di Böttcher*, modificate dal De Grandi (fig. 439), che sono formate da un cerchietto di vetro, con l'orlo inferiore saldato al piano di un portoggetti; il cerchietto però deve recare in basso una piccola tacca, che resta trasformata in foro dalla faccia del vetrino.

Il Casagrandi ha combinato il vetrino Prazmowski con la camera Böttcher, modificata dal De Grandi (fig. 440).



Fig. 440. — Combinazione di Casagrandi, vista di lato.

Sarà descritto più oltre il modo di servirsi dei vari vetrini da goccia pendente.

Presa del materiale. — Occorrendo allungare o stemperare il materiale da esaminare al microscopio, si usano dei *vetrini d'orologio*, di varia grandezza, nei quali esso vien rimescolato con poche gocce del liquido scelto come diluente.

Il materiale da cui si vogliono fare i preparati dev'essere prelevato con un *filo di platino* puro o di platino iridato, del diametro di mezzo millimetro circa, montato in capo ad una bacchetta di vetro lunga circa 20-25 cm.

Il filo può essere usato diritto quant'è lungo, *ago di platino*; oppure avvolto all'estremità in modo che ne risulti un occhiello, *ansa di platino* (fig. 441).

In alcuni casi occorre prelevare il materiale per mezzo di *pipette*.

Per fare una pipetta, si prende una canna di vetro, lunga una spanna, e si tappa ai due estremi con ovatta grassa; di poi, tenendola orizzontale, col suo mezzo immerso nel dardo di un'alta fiamma Bunsen o di una fiamma da soffieria, si riscalda fino a che non sia ben rammollita; allora, toglien-

dola dalla fiamma, rapidamente si tirano in senso opposto i due capi, per modo che la parte mediana, molto allungandosi, diventi un fino capillare. Spezzando questo nel mezzo, e saldando alla fiamma i capi rotti, si hanno bell'e pronte due pipette capillari, che comunemente diconsi anche *pipette Pasteur semplici.*

Similmente si ottengono le *pipette Pasteur strozzate*, le quali differiscono dalle prime per avere la canna un piccolo tratto strozzato, a breve distanza dal batuffolo di ovatta che protegge l'apertura.

Le *pipette Roux* differiscono da quelle *Pasteur* perchè hanno, invece di una, due strozzature, fra le quali resta compresa l'ovatta, e perchè sogliono anche avere il corpo più ampio del tratto di canna compreso fra le due strozzature.

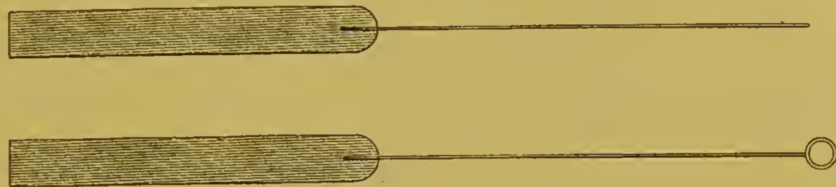


Fig. 441. — Ago ed ansa di platino.

Quando si vogliono conservare delle pipette assolutamente sterili, allora, dopo averle preparate, senza saldarne l'estremità affilata, si circonda con poca ovatta grassa un tratto della canna d'ogni pipetta, e questa quasi tutta, tranne la parte contenente il batuffolo protettivo o poco più, s'introduce in un comune tubo di vetro, la cui bocca venga ad essere ben chiusa dal manicotto di ovatta. Così montate le pipette si sterilizzano nella stufa a secco, e si mettono in serbo per il bisogno.

Maneggio dei vetrini. — Poichè i vetrini, una volta puliti, non devonsi più prendere con le mani, in ogni ulteriore manovra si adoperano delle *pinze.*

Per tener fermi i vetrini durante alcune operazioni servono vari tipi di pinze a pressione: ottima la *pinza Cornet* (fig. 442). Essa è formata da una larga striscia di metallo, incurvata nel mezzo tanto che le due metà divengano parallele, e queste a loro volta ripiegate ancora l'una verso l'altra in guisa che per mezzo di tacche opportune s'incrocino; le parti terminali, che dopo l'incrociamento si vanno facendo sempre più strette, sono di nuovo incurvate l'una contro l'altra, e finiscono con un ciglio dritto, lungo quasi mezzo cm., così che combaciano perfettamente. Al momento del bisogno, s'impugna la pinza e se ne stringono le lamine in modo che le due branche terminali si allontanino appena da lasciar passare frammezzo un vetrino coproggetti; questo, quindi, appena si allenti l'impugnatura, resta preso e fermato.



Fig. 442. — Pinza Cornet.

Quando occorre prendere, capovolgere o comunque spostare i vetrini, si usano le così dette *pinze da microscopia.* Anche di queste esistono vari tipi: il più semplice è formato da due branche diritte, con estremità regolarmente tagliate ed aventi le facce interne lisce, sicchè possano ben combaciare.

Vi sono anche le così dette *pinze a pressione* con le branche incrociate, a un dipresso come quelle di Cornet, però sempre con l'estremità lisce e combacianti per un buon tratto della loro superficie.

Lavaggio dei preparati. — Per lavare i preparati colorati bisogna avere *acqua comune* ed *acqua distillata*. Per allungare o stemperare, quando occorre, il materiale di studio, si può usare acqua distillata o soluzione fisiologica, eventualmente sterilizzate.

Non avendo a disposizione un robinetto di conduttura, l'acqua comune, come del resto anche la distillata e la soluzione fisiologica, si può tenere in grandi *boccioni*, capaci di 10 litri, collocati sopra una mensola a circa 2 metri di altezza, e provvisti di un tappo biforato di sughero compatto o di gomma (fig. 443). Il tappo dev'essere attraversato da un breve tubo di vetro, chiuso in alto con ovatta, il quale serve a mantenere la pressione atmosferica sul liquido, e da un altro tubo piegato due volte ad angolo retto, pescante con l'una estremità presso al fondo del recipiente e congiunto con l'altra ad un tubo di gomma. Questo vien giù, recando nell'altro capo, a portata di mano, un tubo di vetro terminante a tronco di cono: una volta promosso il sifonaggio, il getto dell'acqua si provoca o s'interrompe maneggiando una pinza a molla o a pressione, applicata al tubo di gomma.

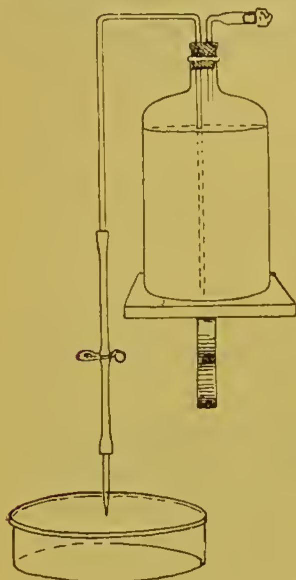


Fig. 443. — Boccione per liquidi da lavaggio.

Invece di boccioni così fatti, ve n'è di quelli che hanno nella parete, in prossimità del fondo, un orifizio, il quale si chiude col tappo attraversato dal tubo di efflusso; mentre il tappo del collo ha un solo foro, per il tubo di comunicazione con l'aria esterna.

L'acqua distillata suol tenersi anche nelle *spruzzette* (fig. 444), ossia bottiglie con tappo biforato, attraversato da due tubi, uno lungo pescante al fondo ed esternamente incurvato ad angolo acuto, l'altro breve ed esternamente piegato ad angolo ottuso: i tratti di questi due tubi che sormontano il tappo devono essere assai corti, per togliere la tentazione di applicarvi le labbra, il quale atto è usuale in chimica, scorretto in batteriologia.

Per raccogliere l'acqua di lavaggio, ed in generale i liquidi di rifiuto durante le varie operazioni, si usano ampie *bacinelle di vetro* (fig. 443), in cui si tiene una certa quantità di forte soluzione disinfettante; o meglio *bacinelle di ferro smaltato*, che occorrendo possono sterilizzarsi a vapore.

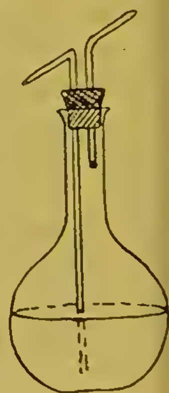


Fig. 444. Spruzzetta.

Asciugamento, montatura, smontatura dei preparati. — Per asciugare i preparati colorati, serve una provvista di buona *carta bibula*, che non lasci peluzzi sui vetrini.

Per allestire i preparati a goccia pendente è necessario avere della *vaselina* ed un *pennellino di vaio*.

Per montare i preparati colorati si usa il *balsamo di Canadà;* per osservarli con lenti ad immersione, l'*olio di cedro*.

Per distaccare i vetrini coproggetti dai portoggetti, allorchè si fanno

preparati a fresco semplici o a goccia pendente, servono bene delle *spatoline metalliche*, montate su manico di legno, che si possono sterilizzare direttamente alla fiamma. Per questa e per altre tali manovre si usano anche *aghi di metallo* rigidi, con manico pure di metallo o di legno.

Ricerca dei batteri nei tessuti. — Per la ricerca dei batteri nei tessuti, bisogna fare le sezioni istologiche; quindi essere forniti del *microtomo*, della *stufa da paraffina* e di tutti gli accessori, la cui descrizione qui omettiamo, rimandando ai manuali tecnici d'istologia generale.

II. — PREPARATI A FRESCO SEMPLICI.

Per esaminare al microscopio i batteri viventi non si usano in generale preparati a fresco semplici, fatti cioè mettendo una goccia di liquido batterifero fra portoggetti e coproggetti, poichè le correnti che vi si producono disturbano l'osservazione. Solo si fanno di tali preparati per dimostrare la presenza di singole forme batteriche in un dato liquido, secondo il metodo del Burri.

Si pone allora nel mezzo di un portoggetti una piccola goccia d'inchiostro di Cina diluito con acqua nel rapporto 1:3 e sterilizzato, vi si mescola una minima quantità, appena una punta di penna, del liquido da esaminare, e sulla goccia si adagia un coproggetti: si fa l'osservazione con una lente a secco di forte ingrandimento, p. es. col n. 8* Koristka: i batteri spiccano in bel contrasto sul fondo nero.

La diluzione dell'inchiostro di Cina si può conservare a lungo, aggiungendovi un po' di formolo. Vedremo che questo metodo del Burri, oltre che per la semplice osservazione microscopica, ha importanza anche maggiore per l'isolamento individuale dei batteri.

Per osservare alcuni fini particolari del corpo batterico, specialmente per mettere in evidenza delle granulazioni nel corpo batterico vivente, si fanno dei preparati a fresco speciali, cioè colorati col metodo della così detta *colorazione vitale*.

Secondo Nakanishi si adopera una soluzione diluitissima di turchino di metilene, che si ottiene facendo cadere una goccia di soluzione acquosa del colore al 2 % in 10 cmc. di acqua distillata. Una bacchettina di vetro intinta in questa tenue soluzione colorante si striscia sopra un portoggetti ben pulito e riscaldato.

Il sottilissimo strato liquido si essicca prontamente; se il tono della colorazione appare forte, si striscia sopra una pezzuola pulitissima asciutta tante volte finchè non si ottiene il tono voluto. Allora si pone una goccia del materiale contenente i germi nel mezzo del portoggetti, la si copre con un coproggetti, e si osserva al microscopio.

III. — PREPARATI A GOCCIA PENDENTE.

Servono principalmente per osservare i movimenti dei batteri, ed anche per seguire alcuni processi vitali, come la divisione delle forme vegetative, la formazione e la germinazione delle spore, ecc.

Nel mezzo di un coproggetti, preso con una pinza Cornet, si pone una piccola ansata di materiale, convenientemente allungato se ve n'è bisogno: d'altra parte si spalma della vaselina tutt'intorno alla celletta d'un vetrino di Koch. Rotando allora la pinza rapidamente ma senza scosse, si capovolge il coproggetti e si depone sul portoggetti in modo che, la goccia restando sospesa nel mezzo della celletta, i due vetrini aderiscano bene per mezzo della vaselina. Si può anche procedere in quest'altro modo: il vetrino coproggetti, con la gocciolina nel mezzo, si poggia sopra un foglio di carta bibula; vi si capovolge sopra il portoggetti escavato, e si pigia dolcemente per fare attaccare i due vetrini; ciò fatto, con movimento rapido si rovescia il portoggetti, cui rimane fissato il coproggetti con la goccia pendente.

I preparati a goccia pendente si possono osservare con forti lenti a secco o con lenti ad immersione, tenendo in ogni caso il diaframma ad iride abbastanza stretto. Per agevolare la messa a foco, si consiglia o di cercare prima l'orlo della goccia, con una lente poco forte, e poi sostituire a questa una lente a secco di forte ingrandimento, avvitata ad un'altra ghiera del revolver; ovvero, quando si adoperi l'immersione, mettere a foco prima la vaselina, che è cosa facilissima, e poi spostare a poco a poco il vetrino fino ad incontrare l'orlo della goccia, la cui visione perfetta si aggiusta con lievi movimenti della vite micrometrica.

Similmente si fanno i preparati coi *vetrini Ranvier*, nei quali però non si ha più una vera goccia pendente, sibbene un sottile strato di liquido, compreso fra il coproggetti e il piano sottostante del disco.

Per l'osservazione microscopica degli anaerobi vivi si possono usare i *vetrini Prazmowski*. Si procede anche qui com'è stato descritto, salvo che, prima di capovolgere il coproggetti con la sua goccia sul portoggetti, si mette nel solco circolare un po' di pirogallolo in polvere; ottenuta poi l'adesione dei due vetrini, s'introduce, per mezzo di una pipetta capillare, attraverso il solco a beccuccio che resta aperto sotto l'orlo del coproggetti, qualche goccia di soluzione di potassa. Ritirata la pipetta, si chiude subito l'apertura con una grossa goccia di balsamo.

Usando la *camera Böttcher*, la goccia pendente s'allestisce facendo aderire il coproggetti all'orlo superiore del cerchietto per mezzo di balsamo: s'introduce allora per il forellino sottostante la punta di una pipetta per la quale nella camera si immette idrogeno svolto da un generatore. Passati circa 5 minuti, si ritira la pipetta, e l'orifizio si occlude con balsamo.

L'apparecchio combinato del Casagrandi permette di fare uso dell'uno o dell'altro, o di ambedue i metodi descritti per allontanare l'ossigeno dalla cameretta nel cui spazio pende la goccia da osservare.

Per seguire al microscopio alcuni processi vitali dei batteri, talora anche per bene osservarne i movimenti, occorrendo mantenere una temperatura costante, per lo più di 37-38° C, si richiede l'uso di *tavolini* o di *cassette riscaldanti*, la cui descrizione vedi a pag. 1155.

IV. — PREPARATI COLORATI.

Se ne possono fare di svariatissimi, secondo i colori che si scelgono ed i metodi che si adoperano.

1) Colori d'anilina.

In batteriologia non si usano che colori di anilina, introdotti nella tecnica microscopica dal Weigert nel 1875. Essi distinguonsi, secondo Ehrlich, in *basici* ed *acidi*, non perchè abbiano la reazione corrispondente al nome che portano, essendo anzi essi tutti dei sali neutri o quasi; ma perchè i primi sono sali in cui la parte basica è data dai molteplici derivati d'anilina, mentre la parte acida è rappresentata da acidi minerali od organici semplici; laddove i secondi sono costituiti in modo inverso. Nei colori d'anilina si può distinguere con Ehrlich un aggruppamento atomico centrale o nucleo, che dicesi cromoforo, e delle catene laterali, che gl'impartiscono il carattere basico od acido, conferendogli insieme o rinforzandone le proprietà coloranti, e diconsi aussocromi. Nei colori basici le catene laterali sono prevalentemente gruppi aminici, i cui idrogeni possono essere sostituiti alla loro volta da altri gruppi, per lo più metilici; nei colori acidi le catene laterali sono in preponderanza solfogruppi, nitrogruppi, ossidrili, carbossili.

I colori basici hanno più o meno forte affinità per i nuclei delle cellule, quindi chiamansi anche *colori nucleari*; gli acidi per il protoplasma, perciò diconsi anche *protoplasmatici*. Il corpo batterico si tinge tutto coi colori basici o nucleari.

I colori basici più comunemente usati nella tecnica batteriologica sono i seguenti: fucsina basica, violetto di metile, cristalvioletto, violetto di genziana, turchino di metilene, tionina, vesuvina o bruno di Bismarck. Di pochi altri, che si adoperano in casi speciali, sarà fatta menzione a suo luogo. Tutti i colori basici sono solubili in alcool. Il colore acido più usitato per tingere elementi non batterici, mescolati ai batteri, è l'eosina, di cui sono in commercio varie specie.

Circa il meccanismo per il quale queste sostanze colorano il corpo batterico, l'idea più semplice sarebbe quella di un doppio scambio: le nucleine che, com'è noto, abbondano nel corpo batterico ed hanno funzione acida, si combinerebbero coi derivati d'anilina di natura basica, mentre l'acido che prima era legato a questi resterebbe libero, e sarebbe allontanato con l'acqua di lavaggio. Se non che dagli studi fatti in questo campo, non proprio sui batteri, ma su altri obbietti colorabili e più accessibili a ricerche di tal fatta, risulta che la cosa non è tanto semplice, poichè alla produzione del fenomeno pare concorrano parecchi fattori fisico-chimici. Però qui non è il luogo di ricordare queste ricerche troppo delicate e tuttora in parte controverse.

Ogni colore dà naturalmente la sua propria tinta all'obbietto colorabile; nondimeno vi sono dei colori che ad alcuni elementi impartiscono una tinta diversa dalla loro propria, e diconsi *metacromatici*: gli elementi che prendono la tinta diversa diconsi *cromotropi*. Così lo iodio, che è giallo, tinge l'amido in turchino: iodio ed amido sono quindi rispettivamente un colore metacromatico ed un obbietto cromotropo. Così pure il violetto di metile è metacromatico rispetto alla sostanza amiloide, che tingendosi in rosso, invece di violetto, è cromotropa; il turchino di Löffler è metacromatico rispetto ai granuli polari del bacillo difterico, ecc.

2) Soluzioni coloranti.

Per preparare le soluzioni coloranti bisogna avere a disposizione una *bilancia, palloncini o matracci di vetro, mortai di porcellana e di vetro, misurini, imbuti e carta da filtro, pipette e burette graduate, alberelli con tappo smerigliato, boccette contagocce*: suppellettile descritta in gran parte nella Fisica e Chimica (v. vol. I, p. I).

I colori d'anilina possono sciogliersi in acqua, in alcool, in miscele di acqua e alcool, o in soluzioni di varie sostanze, per lo più acide o basiche, che hanno funzione di mordenti: si distinguono perciò soluzioni acquose, alcoliche, idroalcoliche e mordenzate. Le prime tre sorte di soluzioni possono complessivamente chiamarsi soluzioni coloranti semplici.

a) Soluzioni coloranti semplici.

Le *soluzioni alcooliche* si usano raramente tali e quali; d'ordinario si fanno *sature*, e servono a preparare le soluzioni idroalcooliche e le mordenzate, onde anche il loro nome di *soluzioni alcooliche madri*. Si ottengono così: una quantità varia di sostanza colorante, secondo la sua natura 5-10 gm., si mette in un mortaio e, se già non è in polvere, si polverizza; vi si aggiungono a poco per volta 100 cmc. di alcool a 96°, impastando ed agitando sempre col pestello; quando sia versato tutto l'alcool, deve rimanere indisciolta una certa porzione di sostanza colorante.

Così fatte soluzioni sature si travasano in alberelli, dove possono conservarsi per lunghissimo tempo: si hanno così a disposizione le *soluzioni madri di fucsina, di violetto di genziana, di turchino di metilene*, ecc.

Una *soluzione idroalcoolica* si prepara allungando 10 cmc. delle varie soluzioni alcooliche sature con 100 cmc. d'acqua distillata. Si filtra la soluzione così ottenuta, e si conserva in bottiglia con tappo smerigliato. Per servirsene, bisogna averne una certa quantità in una boccetta contagocce, che però non deve essere mai riempita del tutto.

Nel modo indicato si prepara, per es., la *soluzione idroalcoolica di turchino di metilene*; così pure si preparerebbero quelle di *fucsina*, di *cristalvioletto*, ecc., qualora occorressero.

Le *soluzioni acquose* si fanno sciogliendo in acqua distillata direttamente la sostanza colorante. Così preparasi la *soluzione acquosa di vesuvina* 2‰ e quella di *eosina* 1 ‰ ed 1:20000, tutte e due in uso nella tecnica.

b) Soluzioni mordenzate.

Soluzioni mordenzate diconsi quelle che tengono disciolte sostanze atte a favorire o rinforzare la colorazione: tali sostanze si chiamano mordenti; ma bisogna subito avvertire che sono *mordenti impropri*, nel senso che non agiscono per via chimica, sibbene promuovono soltanto per azione fisica il permeare della soluzione colorante nell'obbietto colorabile. Alcune soluzioni mordenzate si preparano secondo le stesse norme delle idroalcooliche, salvo che invece dell'acqua si usa la soluzione del rispettivo mordente.

Ecco le soluzioni mordenzate più comuni:

Liquido di Ziehl:

Soluzione alcoolica satura di fucsina basica . .	cmc.	10
Soluzione di fenolo 5 %	»	100

Liquido di Kühne o turchino di metilene carbolico:

Turchino di metilene.	gm.	1.5
Alcool assoluto.	cmc.	10
Soluzione di fenolo 5 %	»	100

Cristalvioletto fenicato:

Soluzione alcoolica satura di cristalvioletto . .	cmc.	10
Soluzione di fenolo 2 %	»	100

Oppure:

Cristalvioletto.	gm.	1
Alcool a 90°.	cmc.	10
Soluzione di fenolo 2 %	»	100

Liquido di Ehrlich (conservabile per solo una settimana):

Soluzione alcoolica satura di violetto di genziana	cmc.	10
Acqua di anilina.	»	100

L'acqua d'anilina si prepara emulsionando perfettamente 4-5 cmc. di olio di anilina in 100 cmc. di acqua distillata, e filtrando: il filtrato dev'essere limpido, e se così non è, si rifiltra.

Liquido di Nicolle o tionina fenicata:

Tionina	gm.	1
Alcool a 90°.	cmc.	10
Soluzione di fenolo 1 %	»	100

Liquido di Löffler:

Soluzione alcoolica satura di turchino di metilene.	cmc.	30
Soluzione di *KOH* 1 : 10000	»	100

oppure:

Turchino di metilene	gm.	1
Alcool	cmc.	10
Soluzione di *KOH* 1 : 10000.	»	100

Questa soluzione di *KOH* si prepara facendone prima in acqua distillata una soluzione 1 % e poi allungando 1 cmc. di questa con altri 99 cmc. di acqua.

3) Metodi di colorazione.

Vi sono metodi di *colorazione semplice o monocromatica* e metodi di *colorazione policromatica* : nei primi si fa uso della soluzione di un solo colore, nei secondi si adopera una soluzione di due o più colori mescolati, ovvero successivamente due o più soluzioni, ciascuna di un solo colore.

Usando il primo metodo, si ottengono *preparati colorati semplici*; adoperando due colori diversi, si hanno *preparati con colorazione doppia o di contrasto.*

Gli effetti di una colorazione doppia si possono ottenere anche facendo uso di un solo colore, purchè sia metacromatico.

a) Colorazioni semplici in generale.

Un preparato colorato semplice si allestisce nel seguente modo:

1° si distende sopra un coproggetti, afferrato con le pinze Cornet, un'ansa del materiale (*distensione*);

2° si lascia essiccare il materiale all'aria, oppure tenendo il vetrino alto una spanna sopra una fiamma di gas abbassata (*essiccamento*);

3° si passa tre volte il coproggetti sopra una fiamma di gas inalzata, tenendo in alto la faccia coperta dal materiale, e compiendo, con la pinza, abbastanza lentamente, tre giri in un piano verticale, per modo che ad ogni giro il vetrino capiti un momento sulla fiamma; ovvero si passa il vetrino tre volte attraverso la fiamma, come per tagliarla (*fissazione*);

4° si versano sul vetrino tante gocce di soluzione colorante, da ben coprire il materiale fissato, badando che il liquido non trascorra dall'orlo; si tiene il vetrino orizzontalmente, alto una spanna sulla fiamma abbassata, fino alla comparsa dei primi vapori (*colorazione*);

5° si getta l'eccesso della soluzione colorante e si lava bene con acqua corrente (*lavaggio*);

6° il vetrino si pone tra i foglietti di un pezzo di carta bibula addoppiato, e si asciuga comprimendolo dolcemente; si ripete quanto bisogna questa operazione, spostando ogni volta il vetrino, con una pinza da microscopia, in altri punti della carta ancora asciutti; dopo ciò, per togliere ogni minima traccia d'acqua, il vetrino si può agitare un istante al di sopra della fiamma (*asciugamento*);

7° si mette nel centro di un portoggetti una piccola goccia di balsamo, e vi si capovolge sopra il coproggetti in modo che il materiale colorato venga a contatto del balsamo; si procura che questo si spanda uniformemente, senza che vi restino bollicine d'aria, dolcemente pigiando sul vetrino con un ago o una bacchettina di vetro (*montatura*);

8° nel mezzo del vetrino coproggetti si pone una piccola goccia d'olio di cedro (*apprestamento all'immersione*). Si osserva con una lente da immersione, tenendo aperto il diaframma ad iride.

Qualcuno dei diversi tempi enumerati può essere modificato in alcuni casi e metodi speciali. Così, p. es., la colorazione può essere fatta a freddo, oppure a caldo, e per tempi determinati; talora la fissazione può essere preceduta da altre operazioni, ovvero, invece che con la fiamma, essere ottenuta mediante sostanze chimiche, ecc., come apparirà dal paragrafo dei metodi di colorazioni speciali.

b) Colorazioni policromatiche in genere. Liquidi differenziatori o decoloranti.

Le colorazioni policromatiche che si ottengono usando una miscela di più colori, sono poco usate in batteriologia. Per lo più invece si adoperano

successivamente due soluzioni coloranti: si ottengono così le *colorazioni doppie.*

Tali colorazioni hanno in batteriologia lo scopo di riconoscere delle proprietà differenziali fra specie e specie batteriche, ad esempio la così detta resistenza al metodo del Gram e l'acidoresistenza; oppure a mettere in evidenza elementi speciali nel corpo di alcuni batteri, mediante un contrasto di colori, come accade per la dimostrazione dei granuli metacromatici, delle spore, delle capsule: o finalmente a far risaltare alcune specie batteriche fra le altre, o frammezzo o dentro ad elementi figurati non batterici, come avviene per la ricerca del bacillo della tubercolosi e dello pneumococco negli espettorati, o per la ricerca dei gonococchi nel pus uretrale, ecc. Le colorazioni doppie, poichè spesso producono un contrasto di colore fra diversi elementi di un preparato, diconsi anche *colorazioni di contrasto.*

Nell'eseguire una colorazione doppia, all'azione della prima soluzione colorante si può far succedere, senza interporre alcun lavaggio, quella della seconda soluzione: in tal modo si procede, per esempio, alla colorazione del gonococco col metodo Schütz; così anche si può fare nella colorazione dei granuli cromotropi del bacillo difterico secondo il metodo Neisser.

Ma più spesso fra la prima e la seconda colorazione si interpone un lavaggio: questo raramente si fa con acqua semplice, più spesso con altri liquidi, che hanno l'azione di scolorare più o meno perfettamente alcuni elementi del corpo batterico, lasciando intatti gli altri; ovvero di scolorare alcune specie batteriche od elementi figurati non batterici, senza togliere il colore ad altre specie batteriche. Gli elementi o forme che sono stati così privati del colore possono poi essere colorati di nuovo con una soluzione differente dalla prima adoperata. Il secondo colore si sceglie in modo che sia nel maggior contrasto possibile col primo: così, adoprando per la prima colorazione la fucsina o un violetto, per la seconda si fa uso rispettivamente di turchino di metilene o di vesuvina.

I liquidi che si usano fra l'una e l'altra colorazione diconsi *differenziatori* o *decoloranti.* L'acqua può in certo qual modo essere considerata come il più semplice differenziatore. Segue l'alcool; vengono poi con azione più forte l'olio d'anilina, l'olio di garofani, la glicerina; ancora più forte è l'acido acetico; fortissimi gli acidi cloridrico, solforico, nitrico. Questi sono i principali; ma ve ne sono degli altri, che servono in qualche metodo speciale.

Sull'uso speciale dei differenziatori è inutile qui soffermarsi, poichè essi figurano in parecchi dei metodi di colorazione raccolti nel seguente paragrafo.

c) Colorazioni speciali.

Dopo aver detto come si allestisce un preparato colorato semplice, e quale è l'uso dei differenziatori ed il principio delle colorazioni doppie, passiamo ora a descrivere i vari metodi speciali più in uso nella tecnica batteriologica.

Essenzialmente sono tutti o metodi di colorazione semplice o metodi di colorazione doppia; però variano dall'uno all'altro i tempi e le modalità delle diverse operazioni, le quali in alcuni sono anche assai complesse, ed in altri sono precedute, frammezzate o seguite da operazioni sussidiarie, fra cui principale è la mordenzatura.

Ciò premesso, cominciamo dal metodo più usitato, che serve a distinguere tutti i batteri conosciuti in due grandi gruppi; questo è il

METODO DEL GRAM. — A rigore, questo è un metodo di colorazione semplice; ma siccome spesso si fa seguire all'esecuzione di esso una seconda colorazione, così finisce coll'essere in pratica un metodo di colorazione doppia.

Si eseguisce così:

1°-3° come per i preparati semplici (v. p. 1232);

4° si versa del liquido di Ehrlich fresco e filtrato in una capsula di porcellana, e si riscalda fino ai primi vapori; a questo punto s'mmerge ili vetrino con la faccia coperta dal materiale rivolta in giù, e si mantiene la soluzione in leggiero svaporamento per la durata di un minuto;

5° si toglie l'eccesso di colore, buttando prima quel che può cadere, e l'altro rimovendo col poggiare più volte il taglio del vetrino sulla carta bibula; non si lava;

6° si versano sul vetrino poche gocce della soluzione di Gram (J gr. 1, KJ gr. 2, acqua distillata gr. 300) e si attende mezzo minuto;

7° si getta l'eccesso di soluzione di Gram, e si lava con alcool, lasciandovelo sgocciolare sopra, ovvero agitando il vetrino in una vaschettina o in un vetrino d'orologio contenente l'alcool; l'alcool si colora in violetto, sempre più debolmente quante più volte si ripete l'operazione; la quale si interrompe appena l'alcool non viene più colorato;

8° si lava in acqua, si asciuga, si monta.

Quando occorre una seconda colorazione, questa si fa, dopo l'asciugamento del preparato, con soluzione di vesuvina 2 ‰ o di eosina 1 ‰, a caldo, fino ai primi vapori.

Esaminando i preparati colorati col metodo del Gram eseguito fino al tempo 8, si vede che alcune specie di batteri appaiono colorate in violetto, laddove altre specie restano scolorate: le prime si dicono *resistenti al Gram*, le seconde *non resistenti*.

La seconda colorazione in alcuni casi serve appunto quando, essendo mescolate forme dei due tipi, si vogliono ricolorare le non resistenti con una tinta di contrasto. Se invece nel materiale trovansi, accanto a forme battériche resistenti, elementi cellulari dell'organismo animale, la seconda colorazione serve a ricolorare il protoplasma già scolorato di questi. La colorazione di contrasto si fa dopo asciugato il vetrino, con soluzione di vesuvina per i batteri non resistenti, che quindi si tingono in giallo, o di eosina per gli elementi cellulari, il cui protoplasma prende il color rosa: l'una e l'altra soluzione si fanno agire a caldo, fino ai primi vapori.

Il metodo del Gram è stato variamente modificato da molti autori. Una modificazione vantaggiosa consiste nell'usare invece del facilmente alterabile liquido di Ehrlich una soluzione fenicata di cristalvioletto (v. p. 1231), che è stata proposta da Nicolle e che si conserva per assai tempo.

Alcuni autori usano come decolorante, invece dell'alcool, l'olio di anilina puro o l'alcool-acetone (alcool assoluto p. 2 + acetone p. 1).

Altre modificazioni apportate sono così profonde, che il metodo del Gram non ci si riconosce più. D'altra parte conviene avvertire che, poichè secondo

i risultati di esso si differenziano in due gruppi tutte le specie batteriche, tale distinzione sarebbe mal sicura se si variasse a piacere il criterio di giudizio, che in questo caso è appunto il metodo del Gram.

Se vi sono alcuni pochi batteri che si comportano rispetto al metodo originario in modo incerto, così che non si possa dirli con sicurezza resistenti o non resistenti, bisogna pensare che questa proprietà della resistenza al Gram ha vari gradi, e quindi si può del tale o tal'altro bacillo dire, come usano alcuni, che ha una resistenza assoluta o debole.

Con tutto ciò l'uso di qualche metodo sostituito a quello del Gram, come per esempio è quello del Claudius, può riuscire utile a scopo diagnostico, in quanto permette di stabilire un *nuovo* carattere di resistenza, che però non è più quello del Gram, nè va confuso con esso.

Dimostrazione dell'acidoresistenza di alcuni batteri. — Alcuni batteri, come il bacillo della tubercolosi, differiscono da tutti gli altri per questa proprietà, che, una volta colorati, difficilmente poi cedono il colore sotto l'azione anche dei più forti decoloranti, quali gli acidi minerali: per ciò appunto si chiamano *acidoresistenti*. Si possono usare vari metodi.

Metodo Ziehl-Neelsen. — Distendi, essicca, fissa.

Colora con liquido di Ziehl a caldo, fino allo svolgersi di abbondanti vapori.

Lava in acqua e decolora con soluzione di acido solforico al 20 %, fino a che il preparato venga scolorato o conservi una delicatissima sfumatura rosa, sì e no percettibile.

Rilava in acqua, asciuga e ricolora con soluzione idroalcoolica di turchino di metilene fino ai primi vapori.

Lava, asciuga, includi.

I batteri acidoresistenti appaiono di color rosso; gli altri tutti, e gli elementi cellulari, se nel preparato ve ne sono, appaiono colorati in azzurro.

Metodo Koch-Ehrlich. — Distendi, essicca, fissa.

Colora con liquido di Ehrlich fino ad abbondante svolgimento di vapori.

Lava in acqua e rapidamente decolora con soluzione di acido nitrico 1:3.

Rilava in acqua, asciuga, e ricolora con soluzione acquosa di vesuvina 2 ‰ fino ai primi vapori.

Lava, asciuga, includi.

Gli acidoresistenti sono colorati in violetto, tutto il resto in giallo.

Metodo Gabbet. — Distendi, essicca, fissa.

Colora con liquido di Ziehl fino allo svolgersi di abbondanti vapori.

Lava, asciuga.

Tieni immerso il preparato per 30″ in una soluzione di turchino di metilene gr. 2 sciolto in acido solforico 25 % cmc. 100.

Rilava, asciuga, includi.

Gli elementi sono colorati come col metodo Ziehl-Neelsen, dal quale quello di Gabbet in sostanza differisce per essere il decolorante ed il secondo colore mescolati in una soluzione unica.

Metodo di Fontes. — Può considerarsi come una combinazione del metodo di Ziehl-Neelsen e di quello del Gram, ed è stato proposto per differenziare il B. della tubercolosi da alcuni altri acidoresistenti.

Esecuzione:

Distendi, essicca, fissa.

Applica il metodo Ziehl-Neelsen, fino alla decolorazione compresa.

Lava in acqua ed asciuga.

Colora per 2′ con soluzione di cristalvioletto fenicata (v. p. 1231); indi tratta con soluzione di iodio e decolora con miscela di alcool ed acetone a parti eguali, analogamente a quanto si fa nel metodo di Gram.

Lava in acqua e ricolora con soluzione idroalcoolica di turchino di metilene.

Bacilli della tubercolosi rossi, con granuli violetti; altri acidoresistenti violetti, con granuli dello stesso colore, ma di tonalità più intensa.

COLORAZIONE DEI GRANULI METACROMATICI. — *Metodo di Löffler.* — Distendi, essicca, fissa.

Colora fino ai primi vapori col liquido di Löffler (v. p. 1231).

Lava, asciuga, includi.

Il corpo batterico resta colorato in azzurro chiaro, i granuli metacromatici appaiono di colore turchino cupo tendente all'indaco.

Metodo di Neisser. — Si usano due soluzioni, che sono indicate per brevità liquido *A* e *B*.

Il liquido *A* è così composto:

Turchino di metilene Grübler	gr.	1
Alcool a 96°	cmc.	20
Acido acetico glaciale	»	50
Acqua distillata	»	950

Il liquido *B*:

Soluzione acquosa di vesuvina	»	2 ‰

Il metodo si eseguisce così:

Distendi, essicca, fissa.

Colora per 1-3″ col liquido *A*.

(Passa il vetrino rapidamente in acqua: operazione facoltativa).

Butta l'eccesso del colore.

Ricolora col liquido *B* per 3-5″.

Lava, asciuga, monta.

Corpo batterico giallo, granuli metacromatici di color turchino cupo.

Il metodo di Neisser è stato assai variamente modificato, nell'intento di poter differenziare i bacilli della difterite dagli pseudodifterici. Con nessuna di tali modificazioni si è conseguito lo scopo; neppure sembra, col metodo ultimo dello stesso Neisser, che tuttavia qui riproduciamo.

Metodo nuovo di Neisser. — Si fa uso di tre soluzioni coloranti.

Il liquido *A* è lo stesso dell'antico metodo.

Il liquido *B* è così composto:

Cristalvioletto Höchst	gr.	1
Alcool	cmc.	10
Acqua distillata	»	300

Il terzo liquido è una soluzione di crisoidina gr. 1 in acqua distillata bollente cmc. 300.

Il metodo si eseguisce così:

Distendi, essicca, fissa.

Colora a freddo per 2-20″ con una miscela di p. 2 del liquido A + p. 1 del liquido B.

Lava con acqua.

Ricolora per parecchi secondi con la soluzione di crisoidina.

Lava, asciuga, includi.

Metodo Ljubinski. — I due liquidi coloranti sono:

1° Pioctanina Merck	gr.	0.25
Soluzione di acido acetico 5 %	cmc.	100
2° Soluzione di vesuvina 1 ‰.		

Esecuzione:

Distendi, essicca, fissa.

Colora a freddo col primo liquido per ½-2 minuti.

Lava con acqua.

Ricolora col secondo liquido per ½ minuto.

Nel metodo Ljubinski, invece della soluzione di vesuvina, può adoperarsi una soluzione di crisoidina 1 % (Blumenthal e Lipskerow).

Colorazione delle spore. — Le spore di alcuni germi, p. es. quelle del bacillo del tetano, si colorano già coi metodi di colorazione semplice, se non per intero, almeno alla periferia.

Ma di altri germi le spore non si colorano se non con espedienti speciali, atti a favorire la penetrazione del colore nella membrana sporale.

Vi sono più metodi; primo fra tutti il

Metodo di Moeller. — Distendi, essicca e fissa alla fiamma o in alcool assoluto per 2′.

Tieni immerso il preparato in cloroformio per 2′, allo scopo di allontanare il grasso, la lecitina, la colestearina.

Lava e passa in soluzione di acido cromico al 5 %, dove il preparato resti immerso per ½-2-5 minuti, in qualche caso anche 10, secondo la natura delle spore.

Colora a caldo per 1′ circa con liquido di Ziehl, facendolo bollire 1-2 volte.

Immergi il vetrino per 1″ circa in una soluzione di acido solforico 5 %.

Lava in acqua, asciuga. Ricolora con turchino di metilene a caldo fino ai primi vapori.

Lava, asciuga, includi.

I bacilli sono colorati in azzurro, le spore in rosso rubino.

Metodo di Klein (modificato da Heim). — In circa mezzo cmc. di soluzione fisiologica, versata in una provetta, stempera alcune ansate del materiale.

Aggiungi ugual volume di liquido di Ziehl.

Tieni la provetta immersa per 2-5-10′ in un bagnomaria con acqua bollente.

Distendi un'ansa del liquido sopra un coproggetti, ed essicca sulla fiamma.

Passa il vetrino rapidamente in una miscela di alcool ed acqua a parti eguali, contenente per ogni 100 cmc. una goccia di acido solforico.

Lava, asciuga.

Ricolora con turchino di metilene fino ai primi vapori.

Lava, asciuga, includi.

Bacilli azzurri, spore rosse.

Metodo Aujeszky:

Distendi, essicca, non fissare.

Immergi il vetrino per 3-4' in soluzione di HCl 0.5 %₀, riscaldata fino alla comparsa di bollicine.

Lava con acqua, essicca, fissa.

Colora col liquido di Ziehl a caldo fino ai primi vapori; e ripeti questa operazione un'altra volta, dopo 1-2'.

Decolora in soluzione di acido solforico 4-5 %.

Lava in acqua, asciuga.

Ricolora con soluzione idroalcoolica di turchino di metilene.

Rilava, asciuga, monta.

Spore rosse, bacilli turchini.

COLORAZIONE DELLE CIGLIA. — Le ciglia si possono vedere nei batteri vivi mediante l'osservazione in campo scuro, o in preparati a fresco fatti con inchiostro di Cina. L'immagine delle ciglia batteriche allo stato fresco può anche essere riprodotta dalla lastra fotografica.

La dimostrazione delle ciglia con l'uso di soluzioni coloranti è difficile, e non di rado aleatoria. In ogni modo la buona riuscita di qualunque metodo si voglia applicare, è legata all'osservanza rigorosa di tutte quelle precauzioni che già sono state indicate circa la pulizia dei vetrini, il modo di prenderli e la tecnica d'allestimento dei preparati colorati in genere. Aggiungiamo qui alcune altre condizioni da rispettare.

Per colorare le ciglia bisogna far uso di speciali mordenti; se sul vetrino accanto ai batteri ciliati si trovano sostanze organiche estranee mordenzabili, queste dànno dei precipitati, onde il preparato riesce brutto e poco dimostrativo. Appunto per evitare tali precipitati bisogna avere vetrini pulitissimi. È stato descritto il modo col quale si puliscono e si conservano i vetrini; è stato detto come essi non debbano mai essere presi con le mani, sibbene con pinzette.

Ritirati dall'alcool diluito, dove sono conservati, i coproggetti si asciugano ben bene con un pannolino fitto e spesso, poi si mettono sopra una lamina metallica non troppo grossa, che si riscalda fortemente per parecchi minuti mediante una o due fiamme a gas. Raffreddatasi la lamina, i vetrini si spostano con un ago fin sul margine di essa, in modo che possano essere afferrati con una pinza Cornet.

I batteri ciliati da colorare vanno presi da colture fresche, su agar o in brodo; una o più anse di materiale, prelevato con delicatezza, si adagiano sul pelo di alquanta acqua distillata contenuta in un vetrino d'orologio. Si attende un po' affinchè i batteri si spargano per il liquido; poi se ne pre-

leva un'ansata dalla superficie e si depone sopra il coproggetti; la piccola quantità di liquido si spande immediatamente, il che significa essere il vetrino effettivamente ben pulito. Si lascia essiccare all'aria, sotto una campana di vetro; poi si eseguisce uno dei metodi che saranno più oltre indicati.

L. Heim consiglia un laborioso trattamento preliminare del materiale Si usano brodocolture sviluppate in 10-20 ore dentro recipienti con fondo largo, tanto che una ventina di cmc. di liquido nutritivo vi formino uno strato assai basso, di pochi cm. Se vi è sedimento nella coltura, si decanta con cautela il liquido soprastante. A 10 cmc. di questo si aggiunge un cmc. di formalina contenente 4 % di formaldeide; dopo 10 minuti si aggiungono ancora 30 cmc. di acqua, e si versa tutto in un bicchiere a calice, dove si lascia stare per uno o più giorni, fino a che non si vede un netto sedimento al fondo. Si decanta allora, e le ultime gocce di liquido si tolgono mediante carta bibula.

Sopra un portoggetti, si pone una gocciolina d'acqua, e vi si distribuisce una piccola ansata del sedimento.

Sopra i vetrini coproggetti, preparati come è detto sopra, si striscia a zig-zag una parte della sospensione fatta sul portoggeti, e poi si eseguisce uno dei seguenti metodi.

Metodo di Löffler. — Il mordente è così fatto:

Soluzione di tannino 20 %	cmc.	10
Soluzione di solfato ferroso satura a freddo, e lasciata riposare alcune ore	»	5
Soluzione alcoolica satura di fucsina . . .	»	1

Occorrendo, vi si aggiungono alcune gocce di una soluzione *N*/4 di *NaOH* o di *HCl*, secondo i casi, sopra tutto secondo le specie batteriche.

La soluzione colorante si prepara nel seguente modo:

In 10 cmc. di acqua d'anilina recentemente preparata si mettono alcuni cristalli di fucsina; dopo un po' si aggiunge soluzione di *NaOH* 1 ‰ fino a che il liquido colorante divenga trasparente.

Il mordente e la soluzione colorante vanno filtrati prima dell'uso, e non si adoperano se non dopo riconosciuti perfettamente limpidi.

L'esecuzione del metodo è questa:

Fissa passando alla fiamma 2-3 volte il vetrino portante il materiale disteso ed essiccato.

Poni il vetrino, col materiale rivolto in basso, nello scavo di un blocchetto di vetro; versavi sopra il mordente fatto bollire ed ancora caldo; lascia agire per 1-3-5'. Dopo di che togli il vetrino e lava copiosamente da ambo le facce con un violento getto d'acqua.

Asciuga poi cautamente, e fa agire la soluzione colorante a caldo, fino ai primi vapori.

Lava, asciuga, includi.

Nel preparato si vedono i batteri ingrossati ed intensamente colorati in rosso scuro, le ciglia di color rosa più o meno carico.

Molti altri metodi sono stati escogitati, più o meno differenti da quello del Loeffler, ai quali si può ricorrere quando col primo non si ottenga lo scopo.

Il miglior partito del resto è quello di addestrarsi bene in uno di essi, poichè in grandissima parte il buon successo dipende dall'esperienza.

Ricordiamo qui ancora qualche altro metodo:

Metodo De Rossi. — Si usano colture in agar; il materiale si allunga in acqua distillata, e, disteso sul vetrino, si lascia essiccare all'aria.

Si fa uso di un liquido unico, mordente e colorante insieme, così fatto:

Acido fenico	gr.	50
Acqua distillata	»	1000

Sciogli ed aggiungi

Acido tannico.	»	30

Mescola con una

Soluzione di fucsina basica	gr.	25
In alcool assoluto.	cmc.	100

A 10-20 cmc. di questa miscela aggiungi della soluzione di KOH 1 % fino a che si forma un precipitato polverulento. Si filtra e rifiltra fino ad ottenere il liquido limpido.

Esecuzione:

Sul vetrino recante il materiale essiccato si pongono IV-V gocce del filtrato ottenuto: questo appare prima iridescente, poi s'intorbida, da ultimo comincia a dare un precipitato; in questo momento le ciglia si colorano.

Si getta allora subito il liquido, e si lava copiosamente.

Si asciuga, si include.

Metodo Cerrito. — Il materiale si prepara in modo press'a poco simile a quello indicato per il metodo De Rossi.

Il mordente ha questa formula:

Soluzione acquosa 25 % di tannino all'etere . .	cmc.	20
Soluzione acquosa 50 % di allume di ferro . . .	»	10
Soluzione alcoolica satura di fucsina.	»	1

Le soluzioni di tannino e di allume si fanno separatamente in bottiglie chiuse, a bagnomaria; poi si uniscono, e la miscela, sempre in bottiglia chiusa, si ripone in bagnomaria. Il liquido non deve formare precipitati, nè l'aggiunta della fucsina deve produrne.

La soluzione colorante è questa:

Acido fenico	gr.	1
Alcool	cmc.	2
Soluzione alcoolica satura di fucsina . . .	»	5
Acqua distillata	»	20

Esecuzione:

Sul vetrino coperto del materiale essiccato si versa il mordente, e si riscalda sulla fiamma per 30", poi si lava molto bene in acqua corrente, si asciuga, e si rimette altro mordente; queste due operazioni alternate si ripetono 3-4 volte.

Ciò fatto, si colora con la soluzione di fucsina fino ai primi vapori.

In ultimo si lava abbondantemente, si asciuga, s'include.

Nei metodi descritti, ed in parecchi altri, il mordente è dato dal tannino, solo o mescolato con solfato ferroso o con allume, ed il colore che si adopera è la fucsina.

Ma vi sono altri metodi, che possiamo dire fotografici, nei quali le ciglia si rendono visibili mediante soluzioni di sali d'argento. Principali sono quelli di van Ermengem e di Zettnow. Qui ricordiamo solo il

Metodo van Ermengem (modificato). — Il mordente si prepara così:

Si abbiano

A. Soluzione acquosa di acido osmico 2 %.

B. Soluzione acquosa di tannino al 10-25 %.

Si versano in una provetta cmc. 1.5 di *A* e cmc. 3 di *B*; si agita e si filtra; si lascia stare il liquido per alcuni giorni, finchè non prenda colore violaceo bruno.

Questo mordente si fa agire sul materiale per 30'; poi si lava a lungo, e sul preparato ancora umido si fa agire per parecchi secondi una soluzione alcoolica di nitrato d'argento 1 %.

Si versa allora sul vetrino il liquido di sviluppo, che è così composto:

Acido gallico	gm.	5
Tannino	»	3
Acetato potassico fuso.	»	10
Acqua distillata	cmc.	350

Si lascia sgocciolare, e di nuovo si versa della soluzione di nitrato d'argento; dopo 2-3" si forma un precipitato; questo si rimuova subito aggiungendo altra soluzione argentica.

Lava, asciuga, includi.

Bacilli e ciglia restano colorati in nero.

COLORAZIONE DELLE CAPSULE. — *Metodo Friedländer*.

Distendi, essicca, fissa.

Immergi il vetrino in soluzione di acido acetico 1 % per 1-3'.

Essicca rapidamente.

Colora per alcuni secondi con soluzione satura di violetto di genziana in acqua d'anilina.

Lava in acqua ed osserva al microscopio il preparato montato con acqua invece che con balsamo: se la capsula appare troppo colorata da non far vedere i batteri, passa il vetrino per 10" in soluzione di acido acetico 1 % od in alcool al 50 %.

Rilava in acqua, riosserva al microscopio includendo in acqua: se la colorazione è ben riuscita, asciuga e monta in balsamo o in olio di cedro.

Capsula rosa, corpo batterico violetto.

Metodo Johne.

Distendi, essicca, fissa.

Colora per 30" con soluzione acquosa di violetto di metile 2 % o con soluzione idroalcoolica o semplicemente acquosa 2 % di violetto di genziana, leggermente riscaldate.

Lava rapidamente in acqua, poi in acido acetico 2 % per 10".

Rilava con acqua ed esamina il preparato montato in acqua.

Capsula rosa, corpo batterico violetto.

L'inclusione in balsamo fa scomparire o attenua di molto l'immagine della capsula.

Metodo Olt.

Distendi, essicca, fissa.

Colora con soluzione acquosa calda di safranina 3 % (3 grammi di safranina si sciolgono in 100 di acqua distillata, quasi bollente: la soluzione, dopo raffreddata, si filtra).

Lava, asciuga ed osserva in acqua.

Capsula giallo-rosa, corpo batterico di colore amaranto.

Anche con questo metodo l'inclusione in balsamo produce lo stesso effetto che col metodo Johne.

Metodo Raebiger.

Distendi, essicca, fissa.

Colora a freddo, per 1', con una soluzione di gr. 15 di violetto di genziana in gr. 100 di formalina, filtrata 24 ore dopo la preparazione.

Lava, asciuga, monta in balsamo.

Capsula rosa, corpo batterico violetto.

B. — COLTURE ARTIFICIALI.

Per coltivare i batteri, senza di che non si possono studiare moltissime delle loro proprietà, bisogna anzi tutto possedere i necessari *terreni di coltura*, quindi le sostanze e le suppellettili occorrenti a prepararli e sterilizzarli; dei recipienti adatti per distribuirvi i terreni preparati e per seminarvi i germi, come *provette, matracci, palloncini, fiaschette* e *scatole circolari doppie* di vetro, ossia *scatole Petri*; poi disporre di apparecchi atti a mantenere le condizioni favorevoli alla moltiplicazione, cioè di *termostati* a temperatura costante, di *apparecchi anaerobici* per i batteri che si moltiplicano in ambiente privo di ossigeno, di camere umide, che in fondo possono considerarsi come grandi scatole di Petri; inoltre, siccome le colture originarie di qualsiasi germe si ottengono dall'ambiente e dagli organismi e da sostanze e da oggetti svariatissimi, quali offre la natura, bisogna anche avere adatti *strumenti per raccogliere il materiale di studio*, e mezzi da poter determinare il numero dei germi coltivabili esistenti in esso, cioè *contacolonie* ed accessori.

I. — TERRENI DI COLTURA.

Sono *liquidi* o *solidi*; *comuni* per quasi tutti i batteri, o *speciali* per alcuni gruppi o solo per alcune forme batteriche. I terreni solidi o sono tali per loro natura, come le patate, ovvero sono liquidi solidificabili, come il siero di sangue; fra questi ultimi hanno grande importanza quelli che possono essere a piacere liquefatti e risolidificati, come la gelatina e l'agar.

Per preparare i terreni di coltura, oltre le sostanze prime e gli oggetti semplici già indicati nei capitoli o paragrafi precedenti, bisogna avere *pentole* semplici di ferro smaltato, *capsule di porcellana*, *imbuti da filtrare a caldo*, cartine e soluzione di *tornasole*, *apparecchi di distribuzione* e *stufe sterilizzatrici*.

1) Principali apparecchi occorrenti per la preparazione, sterilizzazione e distribuzione dei terreni di coltura.

a) Apparecchi di filtrazione a caldo.

Se ne hanno diverse specie: descriviamo l'

Imbuto di Plantamour, che può essere considerato come tipo. È un imbuto metallico a doppia parete, provvisto di una muffola impiantata, con direzione obliqua in basso, poco più su del collo dell'imbuto. La fascia metallica circolare, che in alto chiude l'intercapedine, ha un foro da introdurvi il termometro ed un altro foro, che può essere sormontato da un imbutino, per versarci l'acqua. Nell'imbuto metallico si adatta un imbuto di vetro, col filtro pieghettato di carta bibula, sul quale si versa il liquido caldo da filtrare, mentre si tiene sotto la muffola una fiamma a gas.

Apparecchio Karlinski. — Per liquidi che, pur essendo caldi, sono molto densi e filtrerebbero male per carta bibula anche a temperatura alta, si adopera l'apparecchio Karlinski. È un recipiente a doppia parete, fatto di metallo robusto, in forma di cilindro che inferiormente si restringe a cono: nel suo fondo si pigia moderatamente dell'ovatta, facendone uno strato filtrante. Il fondo è attraversato da uno spazio tubulare, che fa comunicare l'interno dell'apparecchio con l'esterno. Vi è una muffola come nell'imbuto di Plantamour e per il medesimo scopo. Un coperchio chiude ermeticamente l'apparecchio, cui è fermato per mezzo di viti a pressione; esso ha un imbutino che si può chiudere ed aprire con una chiavetta, e per il quale si versa il liquido da filtrare, caldo, ed un orifizio cui si fissa un tubo metallico pieghevole, proveniente dal corpo d'una pompa aspirante e premente. Per l'azione combinata dell'alta temperatura e della pressione, il liquido filtra attraverso l'ovatta e vien raccolto in un recipiente.

b) Apparecchi di sterilizzazione.

Per la sterilizzazione dei terreni di coltura e dei recipienti destinati a contenerli si adoperano le *stufe a secco*, la *pentola di Koch*, l'*autoclave* e la speciale *stufa per i sieri* di Koch, tutte costruite essenzialmente di metallo.

Stufa a secco. — La stufa a secco è una cassetta metallica, rivestita di asbesto, a doppia parete, munita di sportello anteriore pure a doppia parete; lo sportello chiude perfettamente la cassetta, essendo oblique in senso opposto, quindi combacianti fra loro, la superficie di contatto dello sportello e quella

della corrispondente inquadratura della cassetta. La lamina inferiore della parete di fondo presenta nel mezzo una larga apertura circolare, nella quale si fa dardeggiare la fiamma a gas. Il tetto della stufa è perforato da un canaletto che si chiude con un tappo di sughero; questo è attraversato da un termometro graduato fino a 200° C. e pescante col bulbo e con buona parte della colonna capillare nell'interno della cassetta; inoltre vi è un foro che mette in comunicazione l'intercapedine con l'esterno, e attraverso il quale si fanno sfuggire i prodotti della combustione; oppure una fila di fori i quali si possono tutti chiudere o tutti tenere aperti o semiaperti mediante una striscia metallica, munita pur essa di fori uguali di numero e per grandezza, e scorrevole a slitta sulla parete.

La stufa a secco si adopera nel seguente modo. Gli oggetti da sterilizzare vanno messi in canestrini di filo metallico zincato. Si chiude lo sportello, e si accende la fiamma. Si nota il momento in cui il termometro indica la temperatura voluta, e da questo momento si computa la durata della sterilizzazione. Questa dev'essere in generale di mezz'ora a 160-180° C. Passato il tempo, si spegne la fiamma: si attende un po' di tempo avanti di aprire lo sportello, ma gli oggetti devono lasciarsi raffreddare nella stufa, prima di toglierli. Un segno empirico per giudicare l'avvenuta sterilizzazione è l'imbrunimento dei tappi d'ovatta.

PENTOLA DI KOCH. — La *pentola di Koch* ha varie forme secondo le fabbriche, ma schematicamente è composta di tre spazi cilindrici sovrapposti: l'inferiore, destinato ad accogliere e proteggere a guisa di mantello la fiamma, o meglio la corona di fiamme a gas, è il fornello; quello di mezzo, che contiene l'acqua da svaporare, è la caldaia; quello di sopra, separato dalla caldaia mediante un diaframma crivellato di metallo, serve per mettervi gli oggetti da sterilizzare. Alla caldaia potrà essere annesso un tubo di livello; caldaia e spazio di sterlizzazione sono esternamente circondati di uno spesso strato di feltro o asbesto o linoleo; un coperchio, rivestito pur esso di una di queste sostanze, e munito di un foro da passarvi il termometro, chiude a sfregamento dolce l'apertura dell'apparecchio.

Gli oggetti da sterilizzare, collocati in acconci panierini metallici, si poggiano sul diaframma crivellato: si accende la fiamma, e si attende che tutt'intorno al coperchio cominci ad uscire il vapore. In principio questo esce debolmente, poi fluisce più abbondante e con sempre maggior forza, mentre intanto il mercurio ascende nel capillare termometrico.

Si nota il momento in cui la temperatura tocca i 100°C, e da esso si computa la durata della sterilizzazione, che per lo più è di 30'-45': il termometro del resto comincia a segnare 100 appunto quando il vapore comincia a sfuggire continuamente copioso. Al termine della durata di sterilizzazione, si spegne la fiamma; dopo alcun tempo, si leva il coperchio; quando l'interno della stufa sia raffreddato o quasi, si tolgono gli oggetti.

AUTOCLAVE. — L'*autoclave* è costruita secondo lo stesso schema della pentola di Koch, co' suoi tre spartimenti; salvo che ha pareti robustissime, ed in alto viene ad essere ermeticamente chiusa mediante chiavarde o viti a pressione, per lo più in numero di otto, che forzano il robusto coperchio sull'orlo cilindrico dell'apparecchio, interpostovi un cercine di caucciù o di amianto.

Il coperchio porta nel centro un breve tubo, che si può aprire e chiudere perfettamente con una chiavetta; da un lato una valvola di sicurezza a romano o a saltaleone; dall'altro un manometro, e talora anche un termometro insieme.

Per adoperare l'autoclave, si procede così. Si mettono gli oggetti da sterilizzare, collocati in panierini metallici, nello spartimento superiore, si adatta il coperchio e si avvitano le chiavarde, e, tenendo aperto il tubo centrale del coperchio, si accende la fiamma. Dopo qualche tempo il vapore comincia a sfuggire con rumore stridente, per l'aria commista che trascina seco; a poco a poco, mentre il vapore sfugge sempre in maggior copia, quel cigolio speciale si attenua, fino a non sentirsi più. Appena l'efflusso comincia a compiersi con rumore dolce ed uguale, che significa essere stata l'aria scacciata tutta dall'apparecchio, si chiude la chiavetta del tubo centrale. Il vapore nell'interno acquista pressione e temperatura sempre più alte, che si leggono nei rispettivi strumenti. Mancando il termometro, la temperatura si può conoscere dalla pressione, essendovi fra le due quantità la seguente corrispondenza:

Pressione in atmosfere	Temperatura in gradi C
—	—
0	100
0.5	112
0.75	115
1	121
2	134
3	144

Quando si è raggiunto il grado voluto, si abbassa la fiamma, e si invigila perchè la pressione, quindi la temperatura, resti costante per tutto il tempo della sterilizzazione. Passato il quale, prima di tutto si spegne la lampada; dopo qualche tempo si apre il tubo centrale del coperchio; quando non si vede quasi più traccia di vapore, si svita il coperchio e si leva; quando tutto è quasi raffreddato, si ritirano gli oggetti. La sterilizzazione in autoclave si suol fare a 115-116° C, per la durata di 10-20′.

Apparecchi di sterilizzazione discontinua. — Quando si debbono sterilizzare liquidi che non sopportano temperature troppo alte senza denaturarsi, come p. es. il siero di sangue, si usano apparecchi da sterilizzazione discontinua, secondo Tyndall.

Sono in sostanza dei bagnomaria, rivestiti di asbesto e muniti di termometro, di termoregolatore e di un canestro scompartito per mettervi le provette contenenti il liquido da sterilizzare.

Si adopera nel seguente modo. Vi si collocano i recipienti contenenti i liquidi da sterilizzare: si riscalda allora a poco a poco fino a 58-60°, e questa temperatura si mantiene per 1-2 ore; dopo di che le provette si tolgono e si tengono per 24 ore a 28-30° C. Il 2° giorno si ripete la stessa operazione, e così il 3°, il 4° ed il 5°, avendo sempre cura che per le 24 ore fra un riscaldamento e l'altro le provette siano conservate a 28-30° C.

Così facendo si uccidono, già dopo la prima operazione, le forme vegetative che si trovino nel liquido; delle spore, se ve ne sono, una buona parte

almeno germogliano a 28-30°C nelle prime 24 ore consecutive, sicchè il 2° riscaldamento uccide le forme vegetative novamente nate. Con le ulteriori alternative di riscaldamento a 58-60° e di conservazione a 28-30°C si ottiene che tutte le spore diano forme vegetative, e che queste rimangano successivamente tutte distrutte.

Stufa da solidificare il siero. — Allorchè si deve solidificare del siero di sangue, precedentemente sterilizzato com'è stato descritto, si adopera una adatta *stufa da solidificare il siero*. È una cassetta con doppia parete, rivestita di feltro o d'asbesto, fornita di termometro e termoregolatore, sorretta da quattro piedi, lunghi i posteriori alquanto più degli anteriori, in modo che il piano della cassetta venga ad essere leggermente inclinato in avanti. Nell'intercapedine si mette dell'acqua. I tubi contenenti il siero si sdraiano sul fondo della cassetta; essendo questo inclinato, il liquido si livella in ciascun tubo a becco di clarinetto. Si chiude il coperchio, si accende la fiamma, e si bada che la colonna termometrica salga assai lentamente fino a 85-90°C, alla qual temperatura il siero è già bell'e solidificato.

c) Apparecchi di distribuzione.

Quando occorre nelle provette o in altri recipienti versare il liquido di coltura in quantità precisa, si fa uso di tali apparecchi.

Il *distributore di Treskow* è un palloncino che porta un breve collo in alto, e in basso termina a tubo rastremato; verso il mezzo di questo è saldato un altro tubo, che nel primo tratto, assai breve, è orizzontale e poi, incurvandosi in alto, diviene verticale: nella parte verticale esso è graduato in interi e mezzi cmc. Una chiavetta a due vie trovasi nel punto d'innesto del tubo graduato.

Si adopera così: tenendo la chiavetta in posizione di assoluta chiusura, il liquido da distribuire si versa per il collo nel palloncino. Girando la chiavetta, il liquido passa nel tubo graduato, e si lascia montare fino al segno voluto; subito si gira di nuovo la chiavetta, sempre nello stesso senso, ed allora, interrotta la comunicazione fra il palloncino e il tubo graduato, la si stabilisce invece fra questo e il tubo di efflusso, dal quale si raccoglie il liquido in provette.

La *buretta di Heim* serve allo stesso scopo del palloncino di Treskow: ha il lume di 18 mm., la scala di 47 cm., la capacità di 120 cmc., e sui quattro lati presenta quattro graduazioni diverse, ognuna delle quali permette di distribuire il liquido in quantità di ½, 6, 7, 8 cmc.

2) Preparazione dei terreni di coltura.

a) Infuso di carne.

Per preparare l'infuso, si usa in generale la carne di bue, di vitello o di cavallo. Essa va prima liberata delle zolle di grasso dei tendini, delle aponevrosi e di ogni lacinia connettivale asportabile.

1° La massa si spezzetta o si tritura con un tritacarne;

2° si pesa e si mette nel suo doppio peso di acqua;

3° si lascia a temperatura di stanza fino al giorno susseguente; o soltanto per un'ora, e dopo in bagnomaria a 60° per ancora 4 ore; oppure si può far bollire per mezz'ora, senz'altro;

4° si passa per un panno grosso, spremendovi bene la carne;

5° si tiene per 45' nella pentola di Koch;

6° si filtra per doppio filtro di carta pieghettato;

7° si aggiunge tanta acqua da ottenere il doppio peso della carne adoperata;

8° si versa in matracci o tubi sterilizzati, e si sterilizza nella pentola di Koch per 45'.

L'infuso di carne serve per preparare il brodo, la gelatina e l'agar nutritivi. Può essere sostituito da una soluzione di *brodo Maggi*, che va in commercio sotto forma di dadi.

Gli *estratti di carne*, come quello Liebig ed altri, sciolti in acqua, dànno liquidi nutritivi simili, ma non equivalenti all'infuso di carne.

b) Brodo nutritivo.

Si prepara dall'infuso di carne, cominciando una nuova serie di operazioni dopo il n. 8, cioè:

1° Si mette l'infuso di carne a bagnomaria, fino a che sia riscaldato a 50°-60°;

2° mentre l'infuso sta sul bagnomaria, si aggiunge di peptone secco 1 % e sal di cucina 0.5 %, già prima ben mescolati su carta, e si agita;

3° si porta fino all'ebollizione l'acqua del bagnomaria;

4° si neutralizza con liscivia sodica l'infuso già peptonato, mentre è ancora caldo, rispetto al tornasole; poi si alcalinizza con circa il 7 ‰ di soluzione normale di carbonato sodico, oppure coll'1 ‰ di carbonato sodico cristallizzato, aggiunto in sostanza;

5° allo scopo di chiarificare il liquido, si può aggiungere per ogni mezzo litro una chiara d'uovo, già prima sbattuta col suo doppio volume di acqua fredda;

6° si sterilizza in pentola di Koch per 45';

7° si filtra e, se il filtrato è limpido,

8° si distribuisce in provette, e

9° si risterilizza come è detto al n. 6.

c) Gelatina nutritiva.

Dall'infuso di carne si prepara anche la gelatina nutritiva:

1° All'infuso di carne, quale si ottiene dopo l'operazione n. 8, si aggiunge il 10 % di gelatina in tavole, tagliuzzata: si preferiscono le qualità di gelatina prive di sostanze acide, quali si ottengono da alcune fabbriche, per esempio quella di Schweinfurt;

2° si versa tutto in una pentola, e si riscalda a bagnomaria fino a 50°-60°, alla qual temperatura la gelatina si rigonfia e si scioglie;

3° si aggiunge di peptone secco 1 % e sal di cucina 0.5 %; si agita, e si inalza la temperatura del bagnomaria;

4° si neutralizza con liscivia sodica rispetto al tornasole, poi

5° si alcalinizza con 1 % di soluzione normale di carbonato sodico;

6° si lascia intepidire fino a 50°, e si aggiunge una chiara d'uovo per ogni mezzo litro, secondo l'indicazione notata già per il brodo;

7° si pone nella pentola di Koch, che già sia in pieno svolgimento di vapore, e si lascia stare per 15-30';

8° si filtra a caldo, intorno a 60°, e si raccoglie in un matraccio;

9° si ridiscioglie e si distribuisce in provette;

10° si sterilizza per 30' in pentola di Koch;

11° si tolgono subito i tubi, senza troppo indugiare, e si mettono in un bagno d'acqua fredda, lasciando solidificare la gelatina a cilindro o, se occorre, a becco di clarinetto.

d) Agar nutritivo.

1° All'infuso di carne, quale si ottiene dopo il n. 8, si aggiunge l'1.5 % di agar tagliuzzato: l'agar o gelosio, come anche si chiama, è una sostanza neutra che si ottiene da alcune alghe dell'India orientale, è composta di vari idrati di carbonio, ha reazione neutra, e si commercia in forma di fili;

2° dopo alcune ore, quando i pezzetti sono ben rigonfiati, si mette in pentola di Koch, e vi si lascia stare per un'ora o più, fino a che l'agar non siasi bene sciolto;

3° si aggiunge di peptone secco 1 % e sal di cucina 0.5 %;

4° si neutralizza con liscivia sodica, poi

5° si alcalinizza aggiungendo il 7 ‰ di soluzione normale di carbonato sodico;

6° si tiene nella pentola di Koch per 45':

7° si filtra per ovatta a caldo, intorno a 100°;

8° si distribuisce in provette;

9° si sterilizza a vapore fluente per 40', o in autoclave per 10' a 115° C;

10° si fa solidificare il terreno a cilindro, oppure a becco di clarinetto, nel qual caso si sdraiano i tubi sopra una tavola, in modo che la parte di essi prossima ai tappi poggi sopra una bacchetta di vetro.

e) Patate.

Costituiscono per se stesse un buon terreno di coltura, benchè abbiano reazione acida; inoltre entrano a far parte di alcuni terreni speciali, come vedremo. Meglio che le patate nostrane si prestano le così dette patate olandesi, non molto grosse, di forma ovale, con superficie liscia, senza nodi, con polpa compatta. Si usano le patate *dimezzate*, secondo il metodo di Koch, o in *dischi*, secondo von Esmarch, o in *cilindri*, che poi si dimezzano obliquamente, secondo Roux e secondo Bolton e Globig, o in *tavolette* rettangolari. In qualunque forma si vogliano tagliare, devono essere perfettamente sane, possibilmente con poche e non profonde ombelicature, senza scontinuazioni della buccia.

Metodo di Koch. — Scelte, nel modo già detto, le patate, si detergono anzi tutto d'ogni traccia di terra, spazzolandole e lavandole ben bene sotto un abbondante getto d'acqua; dalle ombelicature od occhi, come si chiamano,

si traggono gli ultimi residui con la punta di un coltello, cercando di non intaccare la buccia, e poi si ripete il lavaggio e la spazzolatura. Si sterilizzano per 45′ a vapore fluente, dal quale appena tolte si dimezzano con una

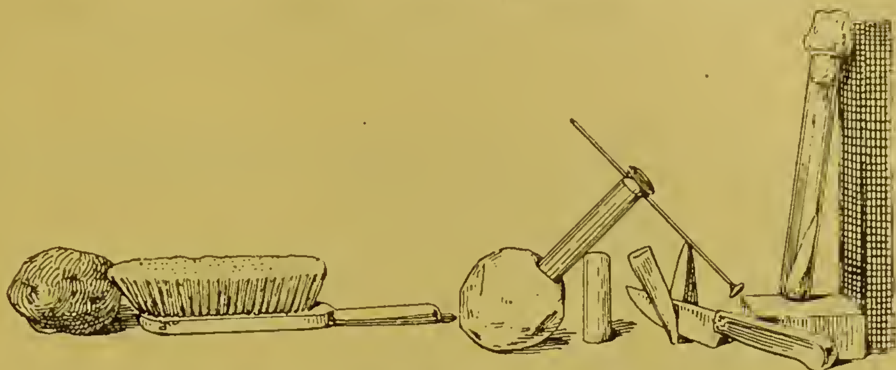


Fig. 445. — Preparazione dei cunei di patate.

lama passata alla fiamma; senza staccare le due metà, si mettono in camere umide lavate precedentemente con soluzione di sublimato 1 ‰ e provvedute di un disco di carta bibula, adattato sul fondo e umettato con soluzione di sublimato.

Per distaccare le mezze patate, e rovesciare una delle due metà, si sollevi appena quanto basta il coperchio della camera umida, e si cerchi di compiere la manovra, badando di non toccare mai la superficie di sezione.

Metodo di Bolton e Globig o di Roux. — Per preparare i cilindri obliquamente dimezzati, si lavano le patate come è detto sopra, indi si sbucciano e si rilavano sott'acqua corrente. Mediante un foratappi, di conveniente diametro, si cavano allora dei cilindri che vengano grossi come un dito, se ne pareggiano le basi e poi si dimezzano, passando il coltello in diagonale da un punto periferico dell'una base al punto opposto dell'altra. Ne risultano così dei pezzi fatti a becco di clarinetto, possiam dire dei cunei, che si introducono in altrettante provette (v. fig. 445).

Per conservare alla patata una certa succolenza, si può mettere al fondo della provetta un batuffolo d'ovatta, che s'imbeve di acqua distillata, eventualmente alcalinizzata, e sul quale viene a poggiare il cuneo (v. fig. 446 *a*).

La sterilizzazione si fa a vapore fluente per 45′.

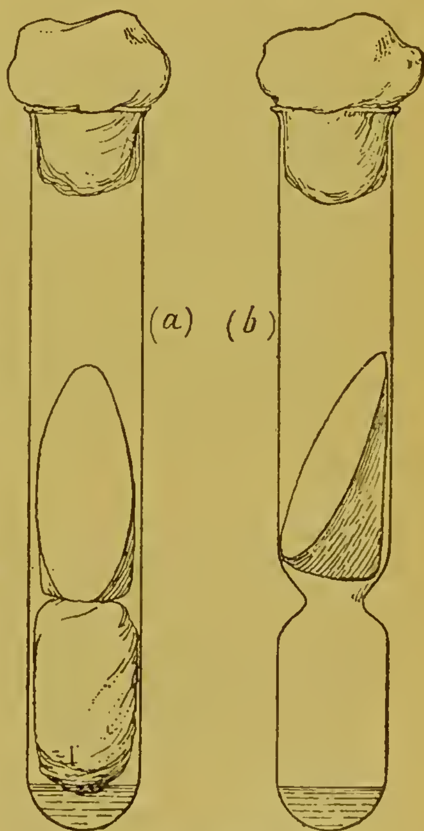


Fig. 446. — (*a*) Cuneo di patata su batuffolo d'ovatta in provetta ordinaria; (*b*) Cuneo in tubo di Roux.

Roux introdusse l'uso di provette che hanno una strozzatura anulare verso il basso, dove resta quindi come un piccolo serbatoio separato dal corpo della provetta (*tubi di Roux*): il cuneo di patata allora poggia sulla stroz-

zatura, e il serbatoio sottostante può riempirsi di qualche liquido, per es., di soluzione di glicerina al 5-6 %, come si usa per coltivare il bacillo della tubercolosi (v. fig. 446 *b*).

Con operazioni preliminari simili a quelle dette per i cunei, e con l'uso di un semplice coltello, si preparano le *tavolette rettangolari* o parallelepipedi, che si introducono poi nelle provette.

Metodo di von Esmarch. — Per ottenere i *dischi*, secondo von Esmarch, dopo aver compiute tutte le operazioni indicate per i cunei, fino all'ultimo lavaggio compreso, le patate si affettano in dischi alti circa un centimetro e si pongono dentro scatole di Petri sterilizzate.

Anche la sterilizzazione dei dischi si fa a vapore fluente per 45'.

Sono state adoperate anche carote, rape, carciofi, tartufi, funghi, pere, mele, banane ed altri prodotti del terreno come sostrati di coltura: per la maggior parte si preparano in modo non dissimile dalle patate. Non sono però nell'uso comune; hanno servito e possono servire solo a qualche studio speciale.

f) Latte.

Si adopera tal quale, o meglio scremato, senza però alcuna aggiunta. Si distribuisce in provette e si sterilizza a vapore fluente per 45'.

Siccome però il latte può contenere delle spore molto resistenti, così è bene tenerlo in osservazione per lungo tempo prima di adoperarlo, allo scopo di assicurarsi della sua sterilità.

Tutte le volte che si può, è meglio raccogliere il latte in modo sterile, provvedendo ad un'accurata asepsi del capezzolo della mucca e delle mani del mungitore, e rinunziando al latte che spiccia durante il primo minuto.

Il *siero di latte* si ottiene dal latte accagliato a 40°: serve tal quale, oppure si mescola con terreni solidi. La preparazione del siero di latte è molto delicata: Kahlbaum da Berlino mette in commercio il *siero di latte con laccamuffa*.

g) Uova.

Si possono adoperare le *uova intere* o le *chiare* o i *tuorli*, come sostrati di coltura o come componenti di alcuni speciali terreni. Devono adoperarsi mentre sono ancora freschissime.

Per usarle *intere*, si lavano bene con acqua saponata calda, poi con alcool; il velo che di questo liquido rimane sul guscio si fa bruciare alla fiamma. Allora con un ago sterilizzato si buca il polo acuto dell'uovo, e per il forellino si passa un ago di platino infettato col materiale da seminare. Si chiude subito il forellino con collodio e poi con ceralacca.

La *chiara* dell'uovo assodato e sgusciato, oppure la chiara estratta allo stato liquido da un forellino aperto nel guscio, previe le dette operazioni, e poi sbattuta e coagulata, si può trattare ulteriormente come se fosse una patata, affettandola in dischi o cavandone dei cilindri da smezzare poi in cunei.

Il *tuorlo* entra nella composizione di speciali terreni, e non si adopera mai solo.

h) Sangue e siero come terreni o componenti di terreni di coltura.

Si usa il sangue o mescolato in quantità determinate coi comuni terreni di coltura liquidi o solidi, oppure aggiunto in poche gocce alla superficie di terreni solidi.

Metodi per ottenere il sangue. — Volendo ottenere *sangue umano* in piccole quantità, si pulisce bene con alcool ed etere il polpastrello di un dito o la pelle della plica ungueale o il lobulo dell'orecchio, si punge con una lancetta sterilizzata, ed il sangue che geme a gocce vien raccolto in pipette capillari, sterilizzate, lavate prima in una miscela anticoagulante, che può essere una soluzione di cloruro e di citrato sodico ana 0.5 %. Quando si vogliano parecchi cmc. di sangue umano, bisogna aspirarlo da una vena, mediante una grossa siringa sterilizzata, e mescolarlo subito con una miscela anticoagulante, ovvero, secondo Cantani, con ugual parte di glicerina.

Per ottenere del *sangue di piccoli animali* da laboratorio, si usa fare un salasso dalla carotide, come sarà descritto più oltre.

Per procurarsi il *sangue di grossi animali* da macello sarebbe buona regola, quando fosse concesso il metterla in atto, di radere i peli sul collo, nel tratto dove cadrà il coltello, lavare ben bene con alcool, e poi, fatto il taglio, lasciar perdere il primo fiotto di sangue, e raccogliere quello che sgorga dopo; ma quasi sempre bisogna accontentarsi che sia osservata soltanto l'ultima condizione. Se animali di grossa o media taglia, come vitelli, avalli, pecore, capre, si hanno a propria disposizione, allora si fa semplicemente un salasso dalla giugulare, ponendo un laccio alla base del collo, incidendo la pelle, e infiggendo nel lume del vaso un trequarti, comunicante con un recipiente di raccolta.

Conservazione del sangue fluido. — Per ottenere il *sangue intero*, comunque si estragga e da qualunque animale provenga, si raccoglie in recipienti che contengano dei liquidi anticoagulanti, in quantità press'a poco eguale a quella del sangue che si vuol raccogliere.

Può servire la ricordata soluzione di cloruro e di citrato sodico ana 0.5 %, o una soluzione di ossalato ammonico 1 %; o anche, poco importando che la parte corpuscolata si sciolga, la glicerina proposta dal Cantani (*sangue glicerolato*).

Defibrinazione del sangue. — Per ottenere del *sangue defibrinato*, il sangue si riceve in palloncini contenenti palline di vetro e sterilizzati, e si agita continuamente per 10-15'. Volendo, si può, con la centrifugazione, separare la parte corpuscolata dal siero.

Modo di ottenere il siero. — Per ottenere il *siero*, il sangue si raccoglie in recipienti che abbiano al fondo delle bacchette di vetro incrocicchiate, le quali servono a favorire la coagulazione, e si lascia riposare, finchè non siasi ben separato il siero. Questo allora si aspira mediante pipette di vetro sterilizzate, e si versa in matracci o provette, secondo il caso.

Per agevolare il travaso del siero e ridurre od eliminare i pericoli d'inquinamento durante la manovra, si usano utilmente i palloni Tizzoni e Centanni, che portano saldata al fondo una bacchetta di vetro verticale, e la-

teralmente, poco distante dal fondo, una tubulatura leggermente inclinata in basso; questa vien protetta da un cappuccio di vetro, che resta fissato per mezzo di un cercine di ovatta, interposto fra la sua bocca e la tubulatura (v. fig. 447). Il siero, una volta separato, si versa dalla tubulatura laterale nei recipienti a ciò scelti. Oppure si può innestare la provetta di raccolta alla tubulatura laterale (v. fig. 448).

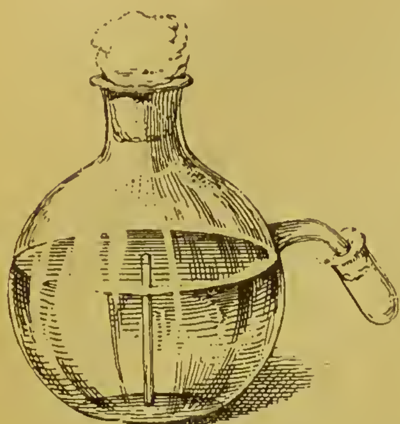


Fig. 447.
Palloncino Tizzoni e Centanni.

Il siero di sangue può essere usato solo, liquido o solido, oppure mescolato a terreni comuni.

Esso dev'essere sterilizzato frazionatamente, com'è stato già detto a proposito delle stufe sterilizzatrici (pag. 1245) per 3-4 volte almeno. Volendo solidificarlo, si fa uso della stufa descritta a pag. 1246.

Per alcuni scopi il siero di sangue si può in laboratorio conservare, in modo da averne una buona provvista, purchè, allo scopo di assicurarne la sterilità, vi si mescoli del cloroformio e si lasci agire per qualche mese.

Il siero di sangue può essere in alcuni casi utilmente sostituito da liquido ascitico, idrocelico, idrocefalico, cerebrospinale.

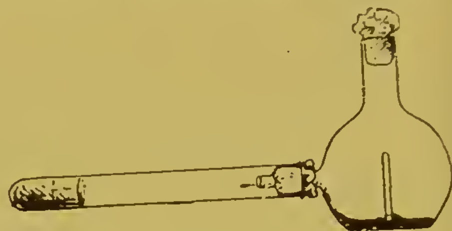


Fig. 448. — Altro tipo di palloncino Tizzoni e Centanni.

Diversi *organi animali* si adoperano anche per fare terreni di cultura, sia in pezzetti che s'immergono in terreni liquidi, p. es. il *polmone* e il *fegato*; sia in forma di poltiglie, p. es. il *fegato* ed il *cervello*.

i) Sostanze varie che per dati scopi si aggiungono ai terreni di coltura.

A moltissimi terreni di coltura sogliousi aggiungere degli *idrati di carbonio*, sopra tutto *zuccheri*, per fornire ai batteri materia da esplicare le loro proprietà fermentative, se ne hanno. Gli zuccheri si aggiungono per lo più in proporzione di 1-1.5 %. Spesso, insieme con gl'idrati di carbonio, si aggiunge della soluzione di laccamuffa, quanto basta per impartire una lieve colorazione violaceo-cipollina al terreno.

Di alcuni terreni fanno parte vari *preparati commerciali*, per lo più di natura proteica, come *nutrosio*, *tropon*, *ematogeno*, ecc.

Dopo aver discorso dei terreni di coltura in generale, e delle più importanti sostanze che servono a prepararli, diamo qui un elenco delle formule dei principali sostrati nutritivi speciali, che saranno poi ricordati a suo luogo nella parte descrittiva dei singoli batteri.

l) Terreni di coltura speciali.

Siero agarizzato. — Si mescola una parte di siero liquido di sangue bovino con una o due parti di agar al 2-3 %, mantenuto liquido intorno a 50°-55°: si fa solidificare a becco di clarinetto.

Agar ascitico. — Il liquido ascitico, sterilmente estratto, si mescola con agar al 3 % mantenuto fluido intorno a 50°-55°, nel rapporto di 1 : 3. Si adopera anche agar glicerinato al 2·5 %. Il sostrato deve avere una reazione debolmente alcalina: perciò, avanti di fare la miscela, si saggi la reazione del liquido ascitico, e secondo che questo ha reazione più o meno fortemente alcalina, si corregga convenientemente quella dell'agar. L'agar ascitico si fa solidificare in provette a becco di clarinetto oppure in piastre.

Agar con sangue. — 1. Il sangue può essere aggiunto in piccola quantità alla superficie dell'agar solidificato a becco di clarinetto in provetta. In tal caso si può far uso di sangue umano, che si ottiene pungendo il polpastrello di un dito o il lobulo dell'orecchio, dopo averli disinfettati, e dopo aver rimosso il disinfettante con acqua sterilizzata. Si prelevano una o più ansate di sangue dalla goccia che esce, e si strisciano sull'agar.

Invece di sangue umano, può usarsi anche sangue di coniglio o di piccione.

Si può anche tenere una provvista di sangue glicerolato, secondo Cantani (v. pag. 1251), ed al momento del bisogno se ne versano poche gocce alla superficie dell'agar.

2. Il sangue si mescola intimamente, in quantità considerevole, con l'agar. A tal uopo bisogna raccogliere il sangue in palloncini sterilizzati contenenti palline di vetro, per defibrinarlo; il sangue defibrinato si mescola con agar al 3 %, liquefatto e mantenuto intorno a 50°, nella proporzione volumetrica di 2 : 5, e si versa in capsule Petri: questo è il metodo di Schottmüller.

Per taluni scopi, invece di sangue defibrinato, si può spesso usare in tal modo anche il sangue glicerolato, ma in piccola quantità, al massimo mezzo cmc.

3. Il sangue si scioglie prima in una soluzione alcalina, indi si agarizza. Così preparasi il così detto terreno Dieudonné (per il V. del colera).

Si raccoglie e si defibrina del sangue di bue, si mescola con ugual volume di una soluzione normale di potassa caustica; si sterilizza il liquido che ne risulta per 30′ nella pentola di Koch. Tre parti di questa soluzione alcalina di sangue si uniscono con 7 parti di agar ordinario, neutro rispetto alla laccamuffa. L'agar si versa in capsule di Petri e si fa prosciugare a 60°-65° C. prima di usarlo.

Il Pergola, per evitare che, nonostante il prosciugamento, l'agar rimanga troppo molle, ha proposto l'agar al 3-4 % invece dell'agar ordinario. Secondo lo stesso Pergola, la soluzione di sangue può mescolarsi con acqua semplicemente peptonata (1 %) e salata (1 %), agarizzata al 3 %.

Similmente si può preparare una *gelatina con soluzione alcalina di sangue.*

Soluzioni d'ovoalbumina. — Il terreno di Lipschütz si prepara così: a 100 cmc. di una soluzione acquosa di albumina secca al 2 % si aggiungono 20 cmc. di una soluzione $\frac{N}{10}$ di soda caustica; il miscuglio si agita, si filtra,

indi si sterilizza discontinuamente, e da ultimo si mescola nel rapporto di 1 : 3 con agar ordinario.

Casagrandi ha proposto un altro modo di utilizzare l'ovoalbumina come sostrato nutritivo.

Si sciolgono 10 grammi d'ovoalbumina secca in 100 cmc. di acqua distillata; la soluzione si filtra, vi si aggiunge 1 % di nutrosio e si alcalinizza debolmente con soluzione normale di soda; si distribuisce in provette e si sottopone alla sterilizzazione discontinua, alla temperatura di 55° C., per 6-7 giorni consecutivi, indi si fa solidificare a becco di clarinetto.

Vi si può aggiungere, invece del nutrosio, l'albumosa di Heyden, nella proporzione del 0.5 % e la glicerina nella proporzione del 3 %.

Siero di maiale con nutrosio, o terreno di Wassermann (per il gonococco). — In un matraccio si allungano 15 cmc. di siero fresco di sangue di maiale con 30-35 cmc. di acqua, vi si aggiungono 2-3 cmc. di glicerina, e 0.8-0.9 gr. di nutrosio. Si agita e si porta fino all'ebollizione, sopra una fiamma libera, agitando sempre. Il liquido, prima torbido, si rischiara.

Così dice Wassermann: però il liquido non di rado coagula, diventando inservibile. Il più delle volte si ovvia a questo inconveniente adoperando 50 cmc. di acqua, invece di 30-35; va naturalmente aumentata la quantità di nutrosio, in modo che questo venga a trovarsi sciolto nella proporzione del 2 %.

Si sterilizza la miscela per 20' in pentola di Koch. Ciò fatto, si mescola a parti eguali con agar al 2 % fluidificato e mantenuto ad una temperatura inferiore a 50° C., indi la miscela si versa in capsule di Petri.

Gelatina di patate o gelatina di Elsner (per il B. del tifo). — Delle patate ben pulite e sbucciate si affettano e si triturano finamente; se ne spreme attraverso una pezzuola il succo, e questo si conserva per 24 ore a temperatura minore di 10°. Il succo, divenuto bruno, si filtra, si pone per mezz'ora nella pentola di Koch e si filtra. Allora vi si aggiunge il 10 % di gelatina, si fa bollire finchè la gelatina sia tutta sciolta, si rifiltra e si distribuisce.

Per correggere la forte acidità di questo terreno, che dicesi di Holz, Elsner aggiunge 25 cmc. di soluzione $\frac{N}{10}$ di carbonato sodico ad ogni 100 cmc. di terreno. Al momento di adoperare questo sostrato, si aggiunge 1 % di KJ.

Estratto idroglicerico di patate con siero, o terreno di Bordet e Gengou (per il B. della pertosse). — Si tagliuzzano delle patate ben pulite e sbucciate, e si fanno cuocere in una soluzione acquosa di glicerina al 4 %. Si filtra, e il filtrato si allunga con 3 parti di soluzione di $NaCl$ al 0.6 %: poi si aggiunge il 2.5 % di agar. Si fa sciogliere l'agar nella pentola di Koch, ed il sostrato così ottenuto si distribuisce in provette nella quantità di 2-3 cmc. per ciascuna.

Al momento di servirsene, si fluidifica il sostrato, si versano in ogni provetta 2-3 cmc. di siero di sangue di uomo o di coniglio o di cavallo; si mescola, e si lascia solidificare a becco di clarinetto.

Brodo lattosato con fenolftaleina, o Brodo di Abba (per il *Bact. coli*). — Servendo questo brodo principalmente per la dimostrazione

del *Bact. coli* nelle acque, alle quali si aggiunge nella proporzione di 1 : 9, esso può considerarsi come una soluzione nutritiva madre.

Si prepara sciogliendo in 1000 cmc. di acqua distillata 100 gr. di peptone Witte, 50 di cloruro sodico, 20 di lattosio; si cuoce nella pentola di Koch per mezz'ora, e vi si aggiungono 5 cmc. di soluzione alcoolica di fenolftaleina all'1 % e tanta soluzione satura di carbonato sodico fino a che il liquido non prenda una colorazione rosea netta. Si distribuisce in palloncini da 100 cmc., e si sterilizza. Al momento del bisogno, si aggiungono 100 cmc. del brodo a 900 cmc. dell'acqua da esaminare.

Allungando 100 cmc. della soluzione madre con acqua distillata sterilizzata, si ottiene un brodo lattosato con fenolftaleina, che distribuito in provette può servire alla dimostrazione della proprietà che alcuni germi hanno di fermentare il lattosio.

Siero di latte laccamuffato, secondo Petruschky (per i Bb. enterici, sotto il qual nome raggruppiamo il B. del tifo, quello della dissenteria, i bacilli paratifosi, ecc.). — Il latte s'allunga con altrettanta acqua distillata, si riscalda a 40-50° C., e vi si aggiunge tanta soluzione di acido cloridrico quanta è bastevole per precipitare tutta la caseina. Si filtra, si neutralizza il liquido con soluzione di carbonato sodico, e si fa bollire per due ore; si neutralizza di nuovo il liquido, si rifiltra, e si rimette a bollire. Il siero dev'essere chiaro come acqua o al più presentare una leggerissima colorazione citrina. Ad ogni 100 cmc. di siero si aggiungono circa 5 cmc. di soluzione di laccamuffa, in modo che ne risulti un colore violetto.

Si distribuisce nei singoli recipienti, e si sterilizza a vapore fluente.

Soluzione di nutrosio glicosato o lattosato, con laccamuffa, secondo Barsiekow (per i Bb. enterici). — Si sciolgono 10 gr. di nutrosio e 5 di cloruro sodico in 1000 cmc. di acqua, facendo cuocere per 3 ore nella pentola di Koch: poi si filtra, badando di interrompere l'operazione appena il liquido non passa più limpido.

D'altra parte 50 cmc. di soluzione di laccamuffa si tengono su bagnomaria a 100° per 15'; vi si aggiungono 10 gr. di glicosio o di lattosio, e si continua a riscaldare per altri 10': la soluzione così ottenuta si filtra, usando la stessa precauzione detta per la soluzione di nutrosio.

Infine le due soluzioni si mescolano, mentre sono ancora calde; la miscela si distribuisce in provette, e si sterilizza a vapore fluente, in tre giorni consecutivi, per la durata di 10' ogni volta.

Si può fare similmente una soluzione di nutrosio con mannite e laccamuffa, sostituendo al glicosio o lattosio la mannite nella stessa proporzione.

Il *terreno di Klopstoch* non è altro che una soluzione di nutrosio laccamuffata, che contiene insieme il glicosio e il lattosio nelle stesse proporzioni indicate da Barsiekow.

Agar con rosso neutro o terreno di Rothberger (per i Bb. enterici). — Si fluidificano 6-8 cmc. di agar in provetta e vi si aggiungono II-IV gocce di una soluzione acquosa concentrata sterilizzata di rosso neutro.

La semina vi si fa per agitazione, quando il sostrato è già intiepidito, intorno a 40°; oppure per infissione, dopo aver raffreddato rapidamente

l'agar in forma di cilindro, sottoponendolo ad un getto d'acqua corrente.

Scheffler modificò il terreno aggiungendovi il 0.3 % di glicosio.

Segale lo modificò più profondamente, in maniera da renderlo un terreno più sensibile alle modificazioni che vi possono apportare i germi. Egli prepara l'agar non dal brodo ordinario, ma da un brodo in cui abbia vegetato il *Bact. coli*, tale quindi da essere privo di zucchero; cura una precisa neutralizzazione rispetto alla laccamuffa; aggiunge il 0.5 % di lattosio puro.

Agar lattosato con laccamuffa, o terreno di Drigalski e Conradi (per i Bb. enterici). — A 1000 cmc. di infuso di carne leggermente alcalino si aggiungono 10 gr. di peptone, 10 gr. di nutrosio o di tropon, 5 gr. di cloruro sodico, 30 gr. di agar: si riscalda per 3 ore a 100° o per un'ora a 120°, finchè tutto sia disciolto. Il liquido così ottenuto si fa sedimentare, poi, mentre è ancora caldo, si filtra o se ne decanta la porzione limpida.

D'altra parte si prepara una soluzione acquosa di laccamuffa secondo il metodo Kubel e Tiemann: la laccamuffa del commercio, ridotta in polvere, si lava con abbondante acqua distillata fino a che cede quasi tutto il colore; l'acqua colorata si filtra e si tratta con acido acetico quanto occorre perchè diventi rossa, indi si evapora in capsula di porcellana fino a consistenza di estratto molle. La pasta così ottenuta si lava con alcool a 90° fino a che quasi non cede più colore rosso-viola, e finalmente si scioglie in acqua distillata calda.

La pasta di laccamuffa si trova in commercio bell'è pronta; sicchè non resta che farne la soluzione in acqua calda. Anche la soluzione del resto può acquistarsi bell'e fatta, da Kahlbaum in Berlino.

Comunque si ottenga, si prendono 15 cmc. della soluzione di laccamuffa, si fanno bollire per 10', e poi, aggiuntivi 130 gr. di lattosio puro, ancora per altri 15'.

Tale soluzione si mescola, mentre è calda, con l'agar ancora liquido; vi si aggiungono 2 cmc. di una soluzione calda di carbonato sodico al 10 %, e 10 cmc. di una soluzione calda di cristalvioletto B Höchst all'1 ‰.

L'agar Drigalski e Conradi così preparato si distribuisce in capsule di Petri.

Prima di servirsene per le ricerche speciali, se ne saggi la bontà, seminandovi il *Bact. coli* ed il *Bact. typhi*: le colonie del primo devono essere spiccatamente rosse, quelle del secondo turchine.

Agar fucsinato o terreno di Endo (per i Bb. enterici). — A 1000 cmc. di infuso di carne si aggiungono 10 gr. di peptone, 5 gr. di cloruro sodico, 30 gr. di agar: si fa sciogliere il tutto nella pentola di Koch. Indi si neutralizza rispetto alla laccamuffa, e si aggiungono 10 cmc. di soluzione di carbonato sodico al 10 %: si fa bollire, si filtra, si aggiungono 10 gr. di lattosio puro; poi 5 cmc. di soluzione alcoolica concentrata di fucsina (10 gr. di fucsina cristallizzata in 100 cmc. di alcool a 96°) e 25 cmc. di soluzione fresca di solfito sodico al 10 %.

Il terreno dev'essere incoloro o appena di color rosa debole.

Il *Bact. coli* vi produce colonie rosse, il *Bact. typhi* colonie incolore.

AGAR CON VERDE DI MALACHITE SECONDO LENTZ E TIETZ (per i Bb. enterici). — A 1000 cmc. d'infuso di carne si aggiunge il 3 % di agar: si fa bollire per 3 ore, poi si aggiungono 10 gr. di peptone e 5 gr. di cloruro sodico, sciolti precedentemente in 250 cmc. d'acqua a debole calore. Si alcalinizza con soluzione di carbonato sodico raggiungendo prima il punto neutro per la laccamuffa, ed aggiungendo poi il 0.3 % in più. Si cuoce per un'ora e si filtra per una pezzuola di tela. Si distribuisce il sostrato in matracci Erlenmeyer per conservarlo.

Al momento del bisogno, si fluidifica una certa quantità del sostrato, e ad ogni 100 cmc. di agar, caldissimo, si aggiunge un cmc. di soluzione di verde di malachite I Höchst in acqua distillata nel rapporto di 1 : 600: si mescola, indi si versa in capsule di Petri.

ACQUA PEPTONATA (per il V. del colera). — Si prepara, anzi tutto, una soluzione madre.

Si sciolgono a caldo 100 gr. di peptone secco Witte, 100 gr. di cloruro di sodio, 1 gr. di nitrato potassico e 2 di carbonato sodico cristallizzato in 1000 cmc. di acqua. La soluzione si distribuisce in palloncini da 100 cmc., e si sterilizza.

Al momento del bisogno, si allungano 100 cmc. della soluzione madre con 900 di acqua distillata sterilizzata; la diluzione ottenuta si distribuisce in provette nella quantità di 10 cmc. per ciascuna, o in matracci o palloncini nella quantità di 50 cmc., e si sterilizza di nuovo.

BILE ALCALINIZZATA, SECONDO OTTOLENGHI (per il V. del colera). — Si filtra per carta una certa quantità di bile di bue, vi si aggiunge il 3 % di una soluzione di carbonato sodico cristallizzato al 10 % ed il 0.1 % di nitrato potassico. Il liquido si distribuisce in provette, nella quantità di 5 cmc. per cia cuna, e si sterilizza per 15-20' in autoclave a mezza atmosfera.

SIERO LOEFFLER (per il B. della difterite). — Si mescolano 3 parti di siero liquido di sangue bovino ed una parte di brodo leggermente alcalino contenente 1 % di glicosio.

Si solidifica tale miscela a becco di clarinetto, nella stufa speciale descritta a pag, 1246.

BRODO DI STOMACO DI MAIALE, O BRODO MARTIN (per il B. della difterite). — Si tagliuzza uno stomaco di maiale, ben lavato. A 200 gr. di tali pezzetti si aggiungono 10 gr. di acido cloridrico puro, 1000 cmc. d'acqua riscaldata a 50° C., ed il miscuglio si mantiene a 50° per 12-24 ore. Indi si fa macerare a 100°, per togliere l'eccesso di pepsina, e si passa per uno strato sottile di cotone idrofilo.

Il liquido così ottenuto si porta a 80°, e a questa temperatura si alcalinizza: i fiocchi che allora precipitano vengono separati mediante filtrazione per carta Chardin.

Si sterilizza il liquido limpido per 5' a 120° in autoclave; poi si rifiltra, si distribuisce nei recipienti adatti e si sterilizza finalmente per 20' a 115° in autoclave.

Agar albumosato o terreno di Hesse (per il B. della tubercolosi). — Si sciolgono a caldo, da una parte, 5 gr. di albumosa di Heyden in 50 cmc. d'acqua distillata; dall'altra, 10 gr. di agar, 10 gr. di cloruro sodico e 30 cmc. di glicerina in 950 cmc. d'acqua. Si mescolano le due soluzioni, la miscela si alcalinizza aggiungendo di una soluzione di carbonato sodico al 10 % una quantità corrispondente ai $^3/_4$ di quella che occorrerebbe per ottenere la neutralizzazione rispetto alla laccamuffa, poi si filtra e si sterilizza. Si distribuisce da ultimo in provette, dove si fa solidificare a becco di clarinctto, e si risterilizza: oppure si versa in capsule di Petri.

Rosso d'uovo mescolato con brodo e solidificato, o terreno di Lubenau (per il B. della tubercolosi). — Fatta la pulizia dei gusci di 5-6 uova, se ne estrae la chiara, ed i tuorli si raccolgono in un matraccio sterilizzato: 5-6 tuorli fanno in tutto circa 100 gr. Si sbattono a lungo energicamente, e quando la massa è divenuta uniforme, vi si versa altrettanto brodo glicerinato al 3 % e si rimescola: la miscela si distribuisce in provette, e vi si fa solidificare a becco di clarinetto, sottoponendola all'azione del calore a 90° per la durata di 2-3 ore, e ripetendo tale riscaldamento in tre giorni consecutivi, a scopo di sterilizzazione.

Soluzione nutritiva di Uschinsky (priva di sostanze proteiche). — In 1000 cmc. d'acqua distillata si sciolgono a caldo 30-40 gr. di glicerina, 5-7 di cloruro di sodio, 0.1 di cloruro di calcio, 0.2-0.4 di solfato di magnesio, 2-2.5 di fosfato potassico e 6-7 di lattato d'ammonio. Si sterilizza, si distribuisce in provette o in matracci, e si risterilizza.

II. — PRELEVAMENTO DEL MATERIALE DA COLTIVARE.

Diciamo qui brevemente come si deve procedere allorchè si voglia fare l'esame batteriologico di un materiale qualsiasi.

1). **Prelevamento dei materiali liquidi o semifluidi o solidi riducibili in poltiglia.**

Vi comprendiamo tutto ciò che nell'ambiente si trova nelle condizioni espresse dal titolo, e dell'organismo animale tutti i transudati ed essudati delle cavità chiuse, gli sputi ed espettorati, il muco della cavità nasofaringea, il pus da qualunque parte provenga, gli essudati delle vie urinarie e genitali, il latte, l'urina, la bile, le feci, i frammenti di organi.

Le regole generali sono:

a) le aperture naturali e patologiche, le soluzioni di continuo, la pelle ancora intatta, prima di essere attraversata da strumenti destinati a prelevare essudati cavitari o altri prodotti morbosi profondi, vanno pulite con alcool ed etere, o con benzina, o semplicemente con soluzione fisiologica sterilizzata, secondo i casi, e tutte le volte che si può. Se è necessario disinfettare nell'interesse medico-chirurgico, bisogna però sempre, dopo tale operazione, rimuovere con uno dei liquidi nominati qualsiasi traccia dell'antisettico adoperato;

b) qualsiasi strumento si debba adoperare, siringhe, pipette, anse, aghi, cucchiaini, spatole, ecc., per prelevare il materiale, deve essere precedentemente sterilizzato alla fiamma, o al calore secco od umido, secondo che comporta il caso, non mai con disinfettanti;

c) quando non sia necessario seminare sul luogo il materiale nei terreni di coltura, si raccolga in adatti recipienti sterilizzati, ma se ne facciano le colture il più presto possibile, seguendo i metodi che più tardi verranno esposti.

Per prelevare del materiale dalle fauci, eventualmente anche dall'orificio anale o dai genitali muliebri, si usano bacchette di vetro, che ad un'estremità portano un batuffolo di ovatta (v. fig. 449). Allo scopo di sterilizzarle e conservarle sterilizzate fino al momento del bisogno, ogni bacchetta è quasi tutta introdotta in una provetta, dentro la quale resta fermata mediante un cercine d'ovatta che fa da tappo.

La sterilizzazione si fa nella stufa a secco.

Quando occorre di fare un prelevamento si estrae la bacchetta e si striscia sulle pareti della cavità orale e faringea, là dove si vede essudato, indi si ripone dentro la provetta.

Per prelevare del materiale dalle cavità nasali, specie dal loro tratto posteriore, come anche dal fondo del condotto uditivo, si usano fili metallici flessibili, muniti di un piccolo batuffolo d'ovatta all'estremità, leggermente incurvati o piegati ad angolo ottuso, secondo il bisogno. Tali fili metallici del resto si condizionano e si sterilizzano come è stato detto per le bacchette di vetro.

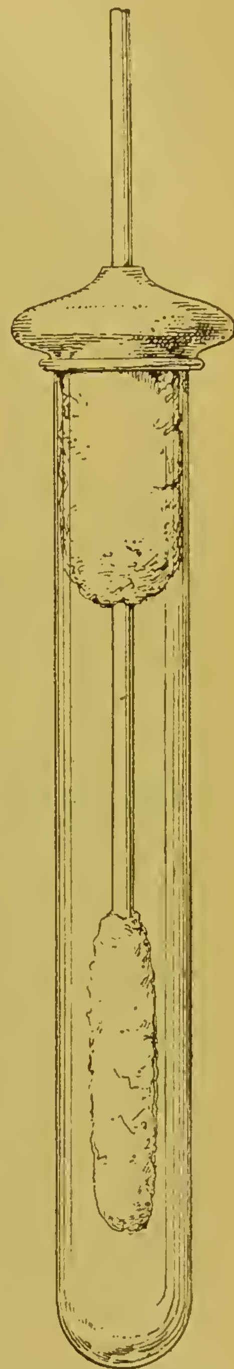


Fig. 449. — Batuffolo per il prelevamento di materiale delle fauci.

2). Prelevamento di materiale batterico aderente a oggetti solidi non disgregabili.

Vi si comprendono le sostanze solide più diverse, grezze o lavorate, p. es. panni, vetri, giocattoli, recipienti di varia materia e forma, utensili e strumenti d'ogni sorta.

Se si tratta di oggetti minuti, possono senz'altro essere trasportati in laboratorio, rinchiusi in adatti recipienti sterilizzati: se no, si fanno sul luogo le seguenti operazioni. Si lava la superficie dell'oggetto ripetute volte con acqua distillata sterilizzata, aiutando l'asportazione del materiale aderente con delle spatole sterilizzate: questa lavatura si raccoglie in vasi sterili e si trasporta in laboratorio, dove si allestiscono poi le colture.

Strumenti speciali si hanno per il prelevamento dell'acqua e del terreno e per raccogliere i germi dell'aria: ma di questi discorreremo in fine della tecnica, in un capitolo destinato al completo esame batteriologico dell'acqua, dell'aria e del suolo.

III. — ALLESTIMENTO DELLE COLTURE IN GENERALE.

I terreni artificiali possono essere seminati con piccole quantità di colture pure, si fanno cioè le così dette *colture di passaggio* o *trapianti*; oppure con materiale contenente più specie batteriche, cioè si fanno le *colture d'isolamento*, con lo scopo di separare e poter poi ottenere le varie specie in colture pure.

1) **Colture di passaggio.**

a) In sostrati liquidi.

La provetta in cui si deve far la semina e quella della coltura da cui si vuol prelevare il materiale si prendono fra l'indice ed il pollice della mano sinistra, press'a poco a livello dell'unione del loro terzo superiore coi due terzi inferiori, con la bocca rivolta verso la propria destra, tenendole accostate ed inclinate tanto che il liquido si disponga a becco di clarinetto, senza però lambire il tappo d'ovatta. Colla mano destra si girano i tappi d'ovatta da sinistra a destra, senza però estrarli, unicamente per assicurarsi che essi non siano in qualche punto attaccati alla provetta (la qual cosa non dovrebbe accadere, ma tuttavia accade talvolta perchè sulla faccia interna della provetta, presso l'apertura, può essere rimasta qualche goccia di liquido nutritivo, appiccaticcio, durante la manovra del riempimento). Si prende allora fra le prime tre dita della mano destra l'ansa di platino, che si sterilizza nel modo seguente : s'immerge quasi perpendicolarmente tutto il filo di platino nell'alta fiamma ossidante della lampada a gas, ed appena fatto incandescente si toglie: si passa tre volte alla fiamma la metà della bacchetta che porta il filo, movendola orizzontalmente da sinistra a destra e viceversa, c nello stesso tempo imprimendole un movimento rotatorio fra le dita; infine s'immerge di nuovo il filo nella fiamma fino all'incandescenza. Ciò fatto, e tenendo l'estremità della bacchetta fra l'indice e il medio, col capo adagiato sulla plica interdigitale fra pollice ed indice, si estraggono i tappi d'ovatta, con movimento elicoide da sinistra a destra, e si pongono ordinatamente l'uno accanto all'altro fra l'indice ed il medio della sinistra, oppure uno fra l'indice ed il medio, l'altro fra il medio e l'anulare, badando che possibilmente resti libera dalla presa quella porzione dei tappi che era introdotta nelle rispettive provette. Si passano allora gli orli delle provette alla fiamma, quindi si prende un'ansata della coltura e si trasporta nella provetta da seminare, immergendola nel liquido e badando di non mai toccare gli orli della provetta durante l'introduzione o l'estrazione dell'ansa, nè di intinger mai la bacchetta nel liquido (vedi fig. 450).

Compiuta questa operazione, l'ansa si sterilizza nel solito modo e si rimette a posto. Si passano rapidamente gli orli della provetta alla fiamma, vi si passano poi anche i tappi uno per uno, e si chiudono con essi le provette, avendo cura di rendere a ciascuna il suo.

Bisogna avvertire ancora che:

1° se la coltura dalla quale si deve fare il trapianto è liquida e la massa batterica sta al fondo, va agitata convenientemente per ottenere una distribuzione uniforme dei germi, prima di prelevarne l'ansata;

2° se è una coltura da strisciamento su terreno solido, il materiale dev'essere prelevato presso l'acqua di condensazione, se ve n'è; in ogni caso dal tratto inferiore della patina, che ivi suol essere più succolenta, quindi più ricca di batteri vitali;

3° se è una coltura su terreno solido per infissione, si adoperi non l'ansa, ma l'ago di platino, cercando d'infiggerlo per un certo tratto lungo il nastrino di coltura, e girarvelo dentro una o due volte a mo' di trivella;

4° che il materiale prelevato non va tuffato di botto nel liquido della nuova coltura che si vuol fare, ma va prima deposto sulla parete della provetta, in prossimità del pelo liquido, ivi stemperato con lievi movimenti trasversali e rotatorî dell'ansa, e poi trascinato dentro il liquido.

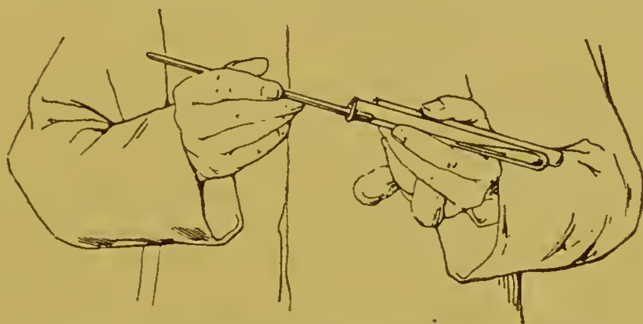


Fig. 450. — Allestimento di una coltura di passaggio.

b) In terreni solidi per strisciamento.

Si fanno colture per strisciamento su patate, su agar, sopra siero di sangue solidificato a becco di clarinetto, ecc.

Si compiono le stesse manovre or ora indicate per le colture in sostrati liquidi; solo bisogna avvertire che l'ansa carica di materiale va introdotta fino al tratto inferiore della superficie da seminare, un po' lontano dall'acqua di condensazione; ivi si poggia e poi si ritira strisciando in linea retta sul terreno.

Anche si può fare lo strisciamento a zig-zag, per ottenere una patina più abbondante; ma quando si vogliono studiare i caratteri della patina che si svilupperà, è bene attenersi alla prima regola.

c) In terreni solidi per infissione.

Si fanno colture per infissione in agar o in gelatina, ed anche in siero, solidificati a cilindro.

Si usa l'ago dritto di platino, e si opera come per gli altri trapianti. Si tocca con la punta dell'ago il materiale; poi l'ago s'introduce nella provetta da seminare, infiggendolo nel cilindro del terreno, lungo l'asse, ed arrestandosi a mezzo cm. circa dal fondo (v. fig. 451).

2) Colture d'isolamento.

Quando si ha del materiale contenente varie specie batteriche, per isolarle si ricorre alle *colture a piatto* in gelatina o in agar, secondo i casi. Le colture a piatto si fanno dentro le *scatole di Petri*, che sono di vetro, rotonde, composte di due metà, l'una delle quali fa da coperchio all'altra (v. fig. 452).

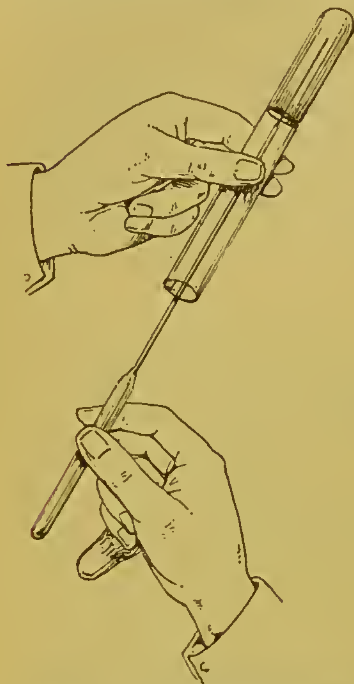


Fig. 451. — Allestimento d'una infissione in gelatina.

Vi è un nuovo modello di scatole Petri: sono di vetro giallo; ciascuna metà è fatta a tronco di cono, e quella che fa da coperchio ha il piano leggermente avvallato, per modo che su di esso possa incastrarsi il fondo di un'altra scatola consimile. Si possono sovrapporre così parecchie scatole in pila, senza pericolo che scivolino (v. figura 453).

Si adopera il così detto *metodo delle diluzioni*, e si procede così. Il materiale, se troppo denso, si allunga prima un po' con acqua distillata o con soluzione fisiologica o con brodo sterile; se è solido o semisolido, si trasforma prima in poltiglia, triturando in mortaio sterilizzato, e si allunga.

Si mettono intanto a fluidificare in bagnomaria 3 provette di gelatina o di agar, si dispongono tre scatole di Petri sopra un cristallizzatore, che è un'ampio recipiente circolare di vetro, pieno colmo di acqua fredda, coperto di una lastra di vetro ben aderente all'orlo smerigliato, e collocato sopra un treppiedi livellabile.

Come i terreni si sono sciolti, si spegne la fiamma del bagnomaria, e si attende che la gelatina sia intepidita fino a 35° o l'agar fino a circa 42° C. o poco meno.

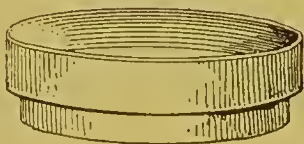


Fig. 452. — Scatola di Petri.

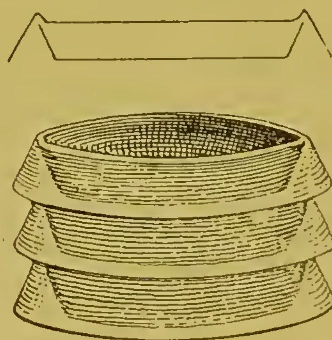


Fig. 453. — Scatole di Petri, nuovo modello.

Si prendono allora con la mano sinistra, nel solito modo, le tre provette del sostrato liquefatto, ed accanto ad esse la provetta col materiale batterifero, in modo che rimanga esterna rispetto alle altre. Sterilizzata l'ansa ed aperte le provette ad una ad una, avendo cura di porre i tappi ordinata-

mente fra le dita libere della mano sinistra, si prende un'ansa di materiale e si distribuisce, agitando ben bene, dentro la prima provetta. Si può allora chiudere il tubo del materiale, e riporlo, così che la mano resti più libera con sole tre provette. Quindi due ansate successivamente prese dalla prima provetta seminata si passano e distribuiscono nella seconda; e tre ansate similmente dalla seconda alla terza, senza mai sterilizzare l'ansa durante questi passaggi.

Ciò fatto, e sterilizzata l'ansa e ripostala, si chiudono le provette, usando le precauzioni già note. Per ottenere una più uniforme distribuzione dei batteri, le provette seminate s'inclinano alternatamente in senso opposto più volte, cercando di non far nascere schiuma.

Si collocano allora le due ultime provette seminate in un sostegno; alla bocca della prima provetta, tenuta mollemente in posizione inclinata nella palma della mano sinistra, si affronta il dorso dell'indice e del medio della destra, e fra essi prendendo il tappo, si estrae; si passa l'orlo del tubo alla fiamma, rapidamente arrotolandolo tre volte; poi colla destra si solleva, solo da un lato, il coperchio della prima scatola Petri, tanto che vi si possa introdurre il collo della provetta, e vi si versa il liquido. Se ne procura l'uniforme distribuzione imprimendo alla scatola leggieri movimenti di altalena sull'orlo del tavolino e girandola secondo il bisogno, affinchè non resti alcun occhio nel disco del terreno; dopo di che si colloca la scatola sul cristallizzatore.

Le stesse operazioni si ripetono per la seconda e terza provetta seminata. Sopra un cartellino incollato sull'orlo del coperchio si notano le indicazioni necessarie, cioè il materiale seminato, il numero d'ordine della scatola, e la data. Prima di rimuovere le scatole per metterle in termostato, si attende che i terreni siano ben solidificati.

Quando le colture a piatto sono sviluppate, si notano e si circoscrivono con lapis da vetro le colonie che appaiono differenti e che possono corrispondere a diverse specie batteriche, e si trapiantano in terreni solidi o liquidi contenuti in provette, allo scopo di ottenere le colture pure.

Tale operazione dicesi *pesca delle colonie*, e si eseguisce in questo modo.

Si mette la piastra sopra un vetro scuro, perchè le colonie risaltino maggiormente. Indi s'invita un aiuto a sollevare il coperchio quanto basta per passarvi sotto l'ago di platino, si tocca la colonia che si vuol trapiantare e si allestisce la coltura.

Quando si vuol seminare in terreni solidificati a cilindro, allora si può fare a meno dell'aiuto: si prende la provetta con la mano sinistra in modo che poggi sul dorso dell'indice e dell'anulare, mentre il medio l'accavalcia dalla parte opposta; il tappo si pone fra l'anulare e il mignolo sinistri; in tal modo resta abbastanza libero il gioco delle dita per poter sollevare il coperchio.

3) **Colture monocitogenetiche.**

Adoperando il metodo delle colture a piatto per l'isolamento dei batteri, non si è sicuri che ogni colonia sia realmente originata dalla moltiplicazione di un solo individuo; anzi per i batteri che presentano aggruppamenti a grappoli o in catene è verosimile immaginare che ciò non accada tanto spesso.

Ma vi sono dei metodi i quali permettono di ottenere colonie da un solo individuo: sono metodi delicati, ma sicuri per lo scopo prefisso.

Hansen ottenne tali colture, che vogliamo col Rossi chiamare monocitogenetiche (espressione corrispondente alla parola tedesca *Einzellcultur*), per i blastomiceti. Egli distribuiva la mescolanza dei blastomiceti che voleva isolare in molta gelatina fluidificata; una goccia di questa, che doveva contenere pochissimi individui, poneva sopra un coproggetti grande, quadrettato. Capovolgeva il coproggetti sull'anello di una camera Böttcher, quindi ricercava al microscopio e contrassegnava quei quadretti che contenevano un solo germe. L'apparecchio veniva messo in termostato, e di tanto in tanto si riosservava al microscopio per colpire il momento in cui nei quadratini contrassegnati si erano sviluppate delle colonie visibili ad occhio nudo. Queste colonie venivano allora trapiantate.

Più recentemente il Burri ha ideato un metodo di allestire colture monocitogenetiche anche degli schizomiceti. Il suo procedimento dicesi metodo dell'inchiostro di Cina, e si esegue così:

Una parte d'inchiostro di Cina (*Pelikan* n. 541, Grübler) si mescola con nove parti d'acqua, e si sterilizza per mezz'ora in autoclave a mezz'atmosfera. Con un'ansa di 5 mm. se ne prendono 4 gocce, e si distribuiscono in fila sopra un portoggetti: con un'ansa di un mm. si trasporta il materiale, da cui si vogliono allestire le colture, nella prima goccia d'inchiostro; un'ansata di questa si trasporta nella seconda, e così via fino alla quarta.

Allora s'intinge la punta di una penna da disegno, ben pulita ed asciutta, e poi passata alla fiamma, nella quarta goccia d'inchiostro, e tenendola quasi orizzontale si punteggia la superficie di una piastra di gelatina, facendo 5-6 serie, ciascuna di 5-6 goccioline del diametro di 0.1-0.2 mm. Immediatamente dopo si coprono le goccioline con un coproggetti grande sterilizzato, e si ricercano al microscopio, usando un forte sistema a secco, quelle goccioline che contengono un solo germe: questo spicca incoloro sul nero dell'inchiostro. Si contrassegnano tali goccioline con altrettanti punti neri sulla faccia inferiore della piastra.

Si attende alcune ore, affinchè i singoli germi osservati diano origine a colonie di almeno 50-100 individui, il che si riconosce al microscopio. Allora si solleva il coproggetti, al quale restano aderenti le goccioline d'inchiostro, e si fanno i trapianti da quelle già contrassegnate.

IV. — COLTIVAZIONE DEGLI ANAEROBI.

Le *colture di trapianto* degli anaerobi si allestiscono in generale come quelle degli aerobi. Soltanto per le *colture d'isolamento*, più che alle scatole di Petri, le quali si usano nell'applicazione di un metodo speciale che sarà più oltre descritto, si ricorre al metodo dell'agitazione in terreni solidi precedentemente liquefatti.

L'unica differenza sostanziale fra i metodi di coltura degli anaerobi e quello degli aerobi è questa, che ai primi, dopo fatta la semina, bisogna procurare con adatti espedienti ed apparecchi un ambiente privo quanto è possibile d'ogni traccia di ossigeno. Sempre allo stesso scopo bisogna

avere anche l'accortezza di far bollire i sostrati di coltura prima di seminarli, affinchè l'ossigeno contenutovi ne venga scacciato.

Si ottiene ciò con quattro metodi: o si procura *l'esclusione dell'aria atmosferica* dal contatto dei terreni seminati, mediante tamponi di varie sostanze sterilizzate; o si procura *l'assorbimento dell'ossigeno* per mezzo di sostanze chimiche; o si fa il *vuoto* nei recipienti di coltura, mediante una tromba aspirante; ovvero si attua la *sostituzione di gas indifferenti* all'aria atmosferica. Gli ultimi tre metodi possono applicarsi così alle singole provette, come ad apparecchi speciali, nei quali si mettono i tubi di coltura appena seminati.

Un quinto metodo di coltivazione degli anaerobi è il metodo *Tarozzi*, che consiste nell'uso di brodo comune o altro sostrato nutritivo, contenuto in provetta, e nel quale sia stato introdotto un pezzetto di organo sterilmente estratto da un animale sano, per lo più un pezzetto di fegato di cavia. In presenza di tessuti animali (come anche, secondo Wrzosek, di frammenti di patate) gli anaerobi si moltiplicano senza aver bisogno di altri espedienti.

1) **Colture di passaggio.**

a) Metodo dell'alto strato o di Liborius.

Si può attuare soltanto per le colture in provette, sia in sostrati liquidi, sia in terreni solidificati a cilindro, gelatina od agar, e seminati o per infissione ovvero per agitazione, com'è stato già detto: sulla maniera di fare le colture per agitazione vedi più oltre, a proposito delle colture d'isolamento.

Se si tratta di sostrati liquidi, vi si versa sopra, dopo averli seminati, dell'olio di vaselina o di oliva sterilizzati ed ancora ben caldi.

Se si tratta di terreni solidi, si versa sopra ai cilindri già solidificati altro terreno della stessa natura, fluidificato, oppure olio di vaselina o di oliva, o anche paraffina liquefatta.

b) Metodo dell'assorbimento dell'ossigeno o di Buchner.

Si fanno le colture in provette, e si tengono pronti altrettanti provettoni di vetro, con al fondo un po' di pirogallolo in polvere.

Ciascuna delle provette seminate s'introduce in un provettone, in modo che resti sollevata dal fondo, poggiando sopra una corta spirale metallica od altro sostegno adatto. Si versa allora della soluzione di potassa, e subito si chiude il provettone con tappo di gomma, la cui tenuta si assicura viemmeglio ricoprendo di paraffina liquefatta l'orlo del provettone ed il prossimo tratto circolare del tappo. La soluzione alcalina di pirogallolo assorbe l'ossigeno dell'aria chiusa nel provettone e nella provetta.

Per un grammo di pirogallolo, che è la quantità consuetamente adoperata, si versano circa 5 cmc. di una soluzione normale di potassa.

c) Metodo del vuoto.

Per applicarlo a colture singole in sostrati liquidi, si adoperano le *provette di Gruber*: possono immaginarsi come ordinarie provette, le quali fra il terzo superiore e i due terzi inferiori siano allungate in forma di un sottile tubo lungo due dita trasverse (v. fig. 454).

Il liquido nutritivo, già sterilizzato in queste provette, si fa bollire prima di seminarlo: la semina si fa aspirando il liquido batterifero in pipette Pasteur, introducendo la parte affilata di esse attraverso lo stretto collo delle provette e lasciandovi cadere una goccia di materiale. Ciò fatto, si abbruciacchia il tappo di ovatta, e con una pinza sterilizzata si spinge contro la strozzatura; indi la bocca della provetta si chiude con un tappo di gomma attraversato da un tubo di vetro, il quale si congiunge ad una tromba aspirante; dopo 15-30′, mentre ancora la tromba è in azione, si dirige il dardo di una fiamma a gas contro il collo della provetta. Appena che questo è rammollito, si tirano in senso opposto il corpo e la bocca della provetta,

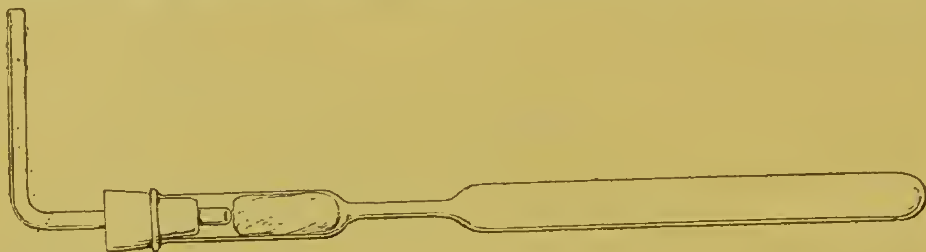


Fig. 454. — Tubo di Gruber.

in modo che l'interposta parte affilata rimanga chiusa; con ciò resta sopra il livello del liquido un vuoto, che certamente è relativo, ma sufficiente allo scopo nella massima parte dei casi.

d) Metodo di sostituzione.

Questo metodo consiste nel sostituire all'aria atmosferica, contenente l'ossigeno, un gas indifferente, che cioè non solo permetta agli anaerobi di bene svilupparsi, ma anche non ne modifichi le funzioni vitali.

All'aria atmosferica si sostituisce in genere l'idrogeno, che è il gas più adatto a ciò. L'idrogeno si ottiene da un generatore, per es. da un apparecchio di Kipp, facendo agire l'acido solforico sullo zinco granulare. L'idrogeno si purifica facendolo gorgogliare in una soluzione potassica di pirogallolo, che trattiene le tracce di ossigeno commiste, poi in una soluzione di nitrato di piombo al 10 %, per precipitare i vapori di acido solfidrico, e finalmente in una soluzione di nitrato d'argento al 10 %, per precipitare l'anidride fosforica. Di queste tre sorte di purificazione la prima è di gran lunga la più importante; le altre due possono in alcuni casi essere tralasciate.

Per applicare il metodo alle colture singole, in sostrati liquidi, si adoperano provette di Gruber, ed allora, dopo averle seminate, vi si lancia dentro un fine getto d'idrogeno, mediante pipette congiunte al generatore; passati pochi minuti, quando si presume che l'aria sia stata tutta sostituita

da idrogeno, si chiude alla lampada la porzione sottile delle provette, mentre s'interrompe il flusso del gas (v. fig. 455).

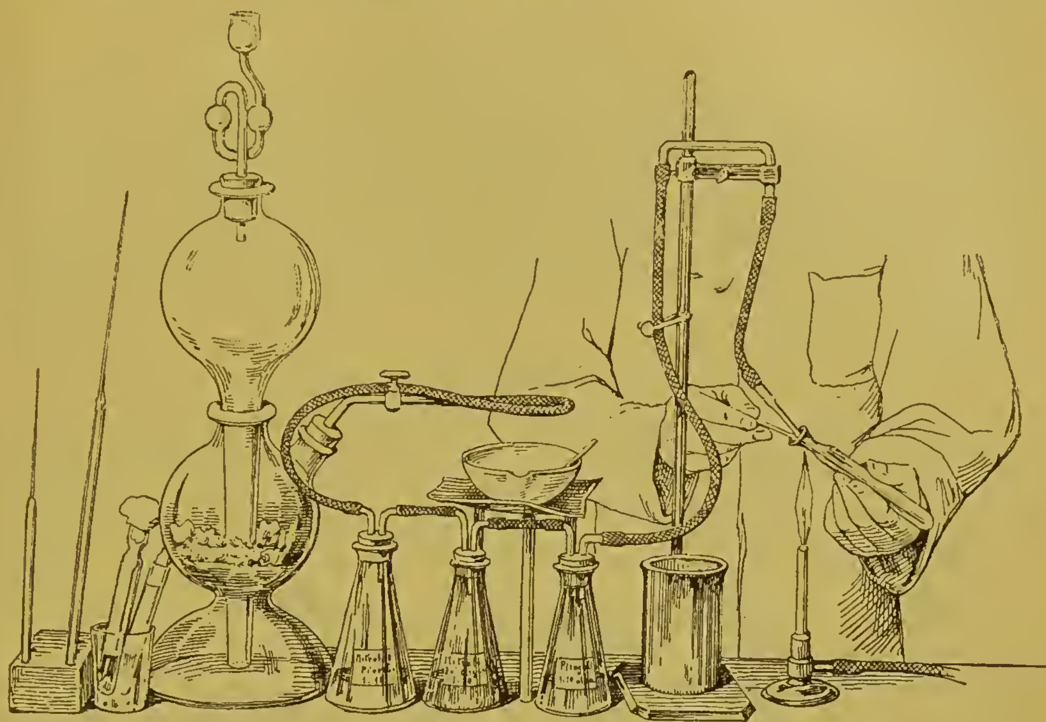


Fig. 455. — Coltura anaerobia in provetta: sostituzione d'idrogeno.

Si può anche lo stesso metodo applicare a colture liquide in provette o matracci comuni, i quali però siano chiusi non con tappo d'ovatta, ma di gomma. biforato e attraversato da due tubi di vetro piegati a gomito. Il braccio verticale di uno di questi tubi deve pescare nel liquido colturale, l'altro deve arrestarsi appena sotto il tappo: il braccio orizzontale di ciascuno di essi presenta una strozzatura e deve essere chiuso da un batuffolino di ovatta (v. fig. 456). L'idrogeno immesso per il tubo lungo, gorgogliando nel liquido di coltura, diluisce gradatamente l'aria fino a che non la sostituisce del tutto. Giunto il momento opportuno, si chiude alla fiamma la strozzatura del tubo corto, mentre d'altra parte s'interrompe il flusso dell'idrogeno; poi si chiude la strozzatura del tubo lungo. Con mastice di Arkanson (1) o con

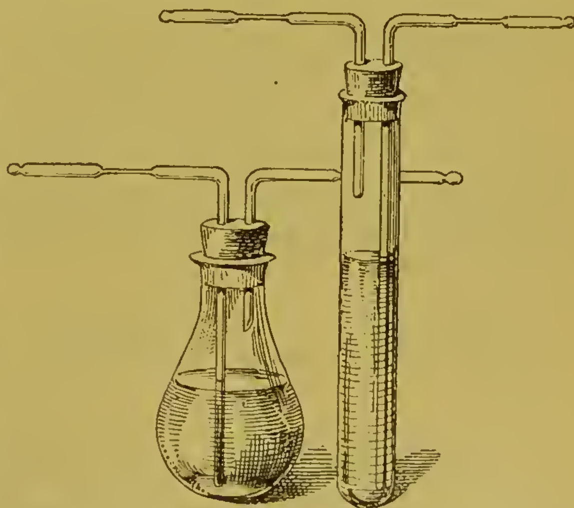


Fig. 456. — Colture anaerobie: tubo e matraccio in cui si può fare la sostituzione dell'idrogeno.

(1) Il mastice di Arkanson si ottiene ben mescolando della colofonia e della cera vergine liquefatta nel rapporto di 2 : 3 o di 3 : 2; nel secondo caso il mastice resta più solido.

paraffina bisogna assicurare la chiusura ermetica fra il tappo e il collo del recipiente e fra il tappo e i tubi che l'attraversano.

e) Metodo Tarozzi.

A 10 cmc. di brodo recentemente bollito si aggiunge un grammo di parenchima tal quale, o ridotto in poltiglia, di un organo sterilmente estratto da un animale sano, per lo più da una cavia: serve benissimo il fegato, ma anche possono adoperarsi la milza, il rene, il cervello, ecc. Il materiale può anche essere posto sulla superficie di un agar inclinato. Nei terreni così preparati si semina il materiale: le colture allestite si pongono senz'altro a sviluppare in termostato.

f) Apparecchi speciali di anaerobiosi.

ANAEROBIOSI COL VUOTO E COLL'ASSORBIMENTO DELL'OSSIGENO. — Il *metodo di Buchner* si può usare anche per più provette insieme, adoperando p. es. un comune essiccatore, composto di un vaso cilindrico e di una cupola di vetro che lo può chiudere ermeticamente (v. fig. 457). Sul fondo si sparge una quantità conveniente di pirogallolo, ben mescolato, se si vuole, con sabbia; collocatevi dentro le provette, si versa la soluzione potassica al fondo del recipiente e subito si rimette a posto la cupola, facendone aderire l'orlo smerigliato a quello del vaso cilindrico per mezzo di mastice di Arkanson precedentemente spalmato.

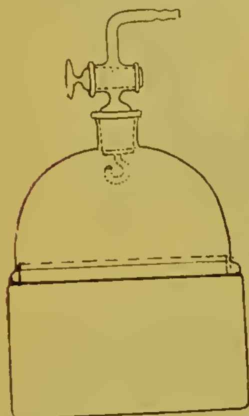


Fig. 457. — Essiccatore, adoperabile per colture anaerobiche.

Anche il *metodo del vuoto* si può usare per più tubi di coltura insieme, ponendoli in essiccatori ben chiusi e con la cupola munita di una chiavetta smerigliata: la tromba aspirante deve in tal caso agire per lungo tempo; dopo una o due ore si chiude la chiavetta, e si assicura l'impermeabilità con mastice di Arkanson spalmato sugli orli di contatto. Il vuoto che si può ottenere in tali recipienti è più lontano dal perfetto che non sia quello prodotto nei tubi di Gruber.

Volendo usare gli essiccatori per ottenere in più tubi insieme le condizioni dell'anaerobiosi, si può anche applicare un *metodo misto*, aggiungendo all'assorbimento chimico dell'ossigeno l'estrazione dell'aria.

ANAEROBIOSI PER SOSTITUZIONE. — Per applicare questo metodo a molte colture insieme, vi sono, fra gli altri, l'*apparecchio di Botkin* e quello *di Petri*.

Apparecchio Botkin. — Esso è costituito di una grande vasca cilindrica di vetro, ossia di un cristallizzatore, e di una robusta campana pure di vetro; nel mezzo della vasca si pone un sostegno, sul quale si collocano le colture; poi si versa della paraffina liquefatta nella vasca e vi si affonda l'orlo della campana, avendo fatto passare sotto di esso le curvature di due tubi di vetro ad U, uno dei quali si arresti internamente poco più su del livello della paraffina, l'altro monti fin verso la volta della campana.

L'idrogeno si fa entrare per questo secondo tubo, sicchè l'aria, che viene sempre più diluita dall'idrogeno immesso, è scacciata per il primo tubo.

Compiuta l'operazione, con delicate manovre si estraggono i due tubi, e si fa solidificare la paraffina destinata ad assicurare la chiusura.

Apparecchio Petri. — L'apparecchio di Petri è pur esso fatto di una campana di vetro, la quale in alto è aperta e nel collo porta un tappo di gomma attraversato da due tubi, esternamente incurvati e muniti di chiavette smerigliate; internamente, uno di essi s'arresta subito sotto il tappo, l'altro è piegato in modo da tenersi accosto alla parete della campana, scendendo fino alla base. L'orlo della campana è piano e smerigliato, e poggia sopra un piatto rotondo di vetro, pure smerigliato. Le colture si pongono sul piatto, e su questo si poggia poi e si fa aderire la campana, il cui orlo sia stato spalmato di mastice.

Per assicurare la chiusura ermetica tutt'intorno, servono tre morsetti, i quali però non devono premere direttamente sul vetro. Perciò sotto il piatto di vetro, e sopra l'orlo sporgente in fuori della campana, interpostovi un tubo di gomma, si adattano due cerchi metallici, con la faccia di contatto piana e con l'altra scanalata da un solco circolare. Nel solco del cerchio inferiore s'incastra il bottoncino fisso della ganascia di ciascun morsetto, nel solco del cerchio superiore viene a premere la punta arrotondata della vite, girevole nella sua madre.

L'idrogeno vi s'introduce come nell'apparecchio Botkin.

Nell'interno della campana vi è un sostegno, sul quale è posto un corpo di porcellana, modellato in maniera da somigliare ad un bulbo d'aglio con gli spicchi divaricati, ma congiunti ancora nella parte inferiore; gli spicchi sono otto, e tutt'insieme circondano una piccola cavità. In questa cavità si pongono poche gocce di soluzione di potassa; fra spicchio e spicchio si adagiano delle striscioline di carta bibula, imbevute di una soluzione di pirogallolo.

Questo apparecchino serve per verificare l'assenza di ossigeno sotto la campana, dopo che vi si è lasciato entrare per un certo tempo l'idrogeno. Infatti, interrompendo le comunicazioni col generatore e con l'aria esterna, ed inclinando tutto l'apparecchio Petri nel senso di una delle striscioline, la soluzione potassica la bagna, e, se ancora vi è ossigeno, la imbrunisce. Bisogna dunque mandare altro idrogeno nella campana.

La verificazione e la nuova immissione di gas vanno ripetute finchè una delle striscioline, bagnata dalla potassa, non diventi più bruna.

2) Colture d'isolamento.

Metodo delle colture a piatto.

Le colture a piatto degli anaerobi si ottengono assai difficilmente, perchè mai si riesce a chiudere ermeticamente le scatole Petri. Però da poi che il Lentz trovò che un'ottima chiusura può aversi con la plastilina, si possono ottenere, facendo uso dell'assorbimento chimico dell'ossigeno secondo Buchner, buone colture a piatto anche degli anaerobi. Si procede nel seguente modo:

Si prende una lastra di vetro rotonda, avente un diametro circa 3 cm. maggiore di quello della scatola Petri scelta per la coltura; con circa 10 gr.

di plastilina, che è una sostanza fittile composta di argilla, sego, cera e gomma, si forma un cerchio del diametro della scatola, adagiandolo sulla lastra di vetro; un mezzo grammo d'ovatta sgrassata si dispone a cerchio, in dentro e a contatto del cercine di plastilina, poi si bagna con acqua e si spiana, indi vi si versa sopra una soluzione recente di gr. 0.7 di pirogallolo in due volte tanto di acqua distillata bollente.

Quando tutto è pronto, si striscia il materiale di semina sopra il terreno nutritivo solidificato in una mezza scatola Petri, e mentre questa si tiene capovolta col terreno affacciato all'ovatta, su questa si versano 4-5 cmc. di liscivia potassica; immediatamente allora si calca l'orlo della mezza scatola sul cercine di plastilina, e si spalma questa tutt'intorno con molta accuratezza per assicurare una perfetta chiusura.

a) **Metodo Sanfelice.**

Si fluidificano fino all'ebollizione tre tubi che contengono circa 10 cmc. di agar per ciascuno; quando l'agar si è intepidito fino a 42°, vi si semina il materiale, col metodo delle diluzioni, agitando molto accuratamente per ottenere una distribuzione uniforme; poi si fa rapidamente solidificare l'agar a cilindro in ciascun tubo, sotto un getto d'acqua fredda.

b) **Metodo Vignal.**

Invece delle comuni provette, si usano allo stesso scopo anche i così detti *tubi di Vignal*, i quali si preparano come le pipette di Roux (v. p. 1225), salvo che la canna adoperata è lunga circa 25 cm.

Il materiale si semina in gelatina od agar, liquefatti dentro una comune provetta; allora si riscalda alla fiamma il tubo di Vignal quant'è lungo, si rompe la parte affilata con una pinza sterilizzata lì per lì, e da essa si aspira il liquido già seminato nella provetta. Ciò fatto, si richiude alla lampada tanto la punta affilata quanto la strozzatura del capo opposto, e del resto si opera secondo quello che è stato detto a proposito del metodo del *vuoto* (v. p. 1266).

V. — SVILUPPO DELLE COLTURE.

Le colture, comunque allestite, vanno collocate in cassette od armadi a temperatura costante, detti termostati, affinchè i germi seminati possano svilupparsi. Bisogna avere almeno un termostato regolato a 37°, ed uno regolato a 22°: questo serve principalmente per lo sviluppo delle colture in gelatina, che a 22° resta solida, se non interviene l'azione fluidificante dei germi seminati.

1) **Termostati.**

Sono cassette metalliche a doppia parete, esternamente rivestite per lo più di asbesto, e provviste di uno sportello la cui spessezza sia fatta in massima parte di materia coibente. La doppia parete in alcuni termostati non è

riconoscibile come tale, essendo sostituita da altra forma costruttiva, che ne fa le veci: esiste quindi sempre come principio.

La temperatura voluta nell'interno spazio utile si mantiene riscaldando la sostanza contenuta nella intercapedine: questa può essere aria, o più spesso acqua.

Si hanno quindi *termostati ad aria* e *termostati ad acqua*.

I mezzi di riscaldamento principali sono il gas, il petrolio (o la benzina, o altri combustibili simili), ed anche l'elettricità; quindi si hanno *termostati a gas, a petrolio, a riscaldamento elettrico*.

Ogni termostato dev'essere fornito di un termometro, internamente sospeso nel mezzo: perciò dietro allo sportello esterno sopra ricordato, vi è anche uno sportello di vetro giallo, attraverso il quale si può verificare la temperatura, senza bisogno di aprirlo, quindi senza bisogno di far entrare aria dell'ambiente esterno nell'interno.

La costanza della temperatura è mantenuta dei così detti *termoregolatori*, dei quali sono diversissimi i tipi.

Descriviamo i principali tipi di termostati coi rispettivi termoregolatori.

a) Termostato ordinario ad acqua e termoregolatori di Soxhlet, di Reichert, ed a spazio regolante.

Lo spazio contenuto nella doppia parete si riempie di acqua distillata, riscaldata prima ad una temperatura di qualche grado superiore a quella cui si desidera montare il termostato; il termoregolatore è collocato in modo che abbia tuffato nell'acqua il serbatoio della sostanza sensibile al calore, e nel resto sporga sopra il tetto del termostato.

Si adoperano per solito i *termoregolatori a mercurio*, ma anche possono adoprarsi quelli *ad alcool ed etere, a toluolo* e simili, i quali tutti devono essere posti sempre in modo che il serbatoio della sostanza sensibile ai disequilibri termici sia tuffato nell'acqua, ed il rimanente sovrasti al tetto del termostato.

Di termoregolatori ve n'è diversi tipi.

Il *termoregolatore di Soxhlet* è fatto di un grosso bulbo di vetro, che in alto si restringe in forma di una canna di calibro assai minore; questa è due volte incurvata, nel primo tratto con la concavità in basso. nel secondo con la concavità in alto, ed ha l'ultima parte verticale rallargata e munita di una tubulatura laterale. Il serbatoio si riempie con una miscela di alcool ed etere; poi si versa del mercurio, il quale rimane disposto ad **U** nella seconda curvatura, concava verso l'alto. La bocca del tubo è chiusa da un tappo di gomma forato ed attraversato da una sottile canna di vetro, piegata a gomito, col braccio verticale provvisto di un forellino e terminante con apertura ellittica. Raggiunta la temperatura voluta, si abbassa la sottile canna di vetro mobile, fino a che l'orifizio obliquo lambisca il menisco del mercurio.

Il *termoregolatore a mercurio di Reichert* (v. fig. 458) può servire per mantenere costante qualsiasi temperatura superiore a 30°.

Esso è costituito di due tubi.

Il più grande è un serbatoio di mercurio, con lume più ampio nel suo terzo inferiore e più stretto nel rimanente, salvo nel quarto superiore, che è leggermente dilatato ad ampolla: esso porta una tubulatura laterale chiusa

da una vite girevole, ed un'altra tubulatura semplice, impiantata più in alto, in direzione opposta alla prima. Questo tubo si riempie di mercurio fino al punto ove comincia l'allargamento ampollare, e viene chiuso da un altro tubo a T, la cui branca orizzontale termina a fondo cieco da un capo, ed è aperta dall'altro, mentre la verticale presenta un rigonfiamento smerigliato, che fa da tappo, e subito sotto di esso diventa sottile, recando ad una certa altezza un forellino, e terminando con apertura obliqua.

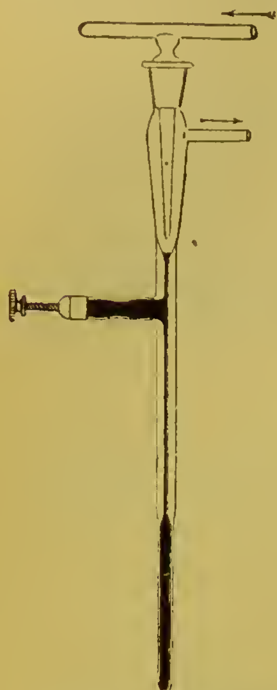


Fig. 458. — Termoregolatore di Reichert.

Il capo aperto del braccio orizzontale del tubo a T si congiunge con la presa di gas, e la tubulatura laterale del tubo maggiore con la lampada che è posta sotto il termostato. Raggiunta la temperatura voluta, si maneggia la vite laterale in modo che il menisco della colonnina di mercurio sfiori l'apertura obliqua del tubo a T.

In questo termoregolatore la sostanza sensibile ai mutamenti di temperatura è data dallo stesso mercurio, ed è facile comprendere come questo, inalzandosi od abbassandosi per aumenti o diminuzioni di temperatura, riduca od accresca l'afflusso del gas alla fiamma, ripristinando l'equilibrio termico.

Il *termoregolatore a spazio regolante* si compone di due tubi: 1° uno di essi, il maggiore, contiene nella sua parte inferiore un lungo tubetto spirale di vetro, svasato in alto a forma di un imbuto, con l'orlo saldato alla parete del tubo stesso; questo nella parte superiore possiede una tubulatura laterale impiantata perpendicolarmente e piegata ad angolo retto in basso; 2° di un tubo più fino, piegato superiormente a gomito e con l'apertura inferiore tagliata a sghembo in sezione ellittica; poco più su di questa esso presenta un forellino rotondo.

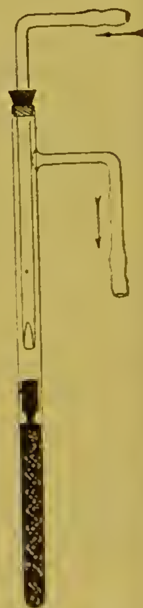


Fig. 459. - Termoregolatore a spazio regolante.

Nel tubo maggiore sta il mercurio, il cui menisco tiene compresso, nello spazio circostante alla terminazione imbutiforme della spirale, uno strato di sostanza liquida sormontata da' suoi vapori, e scelta secondo la temperatura che si desidera di conservare al termostato. Attraverso un tappo di gomma, col quale si chiude il tubo maggiore, scende il braccio lungo del tubo più fino. Per mezzo di due tubi di gomma si congiunge il tubo più fino con la presa di gas, ed il tubo maggiore con la lampada collocata sotto il termostato. Il gas per il tubo di afflusso passa in quello di efflusso che lo circonda, e da questo va ad alimentare la fiamma. Ad una temperatura determinata, variabile secondo la sostanza rinchiusa nello spazio regolante, il menisco del mercurio sale fino ad occludere quasi l'apertura inferiore del tubo interno, sicchè il gas esce soltanto per il forellino sovrapposto; se la temperatura si abbassa, allora il menisco scende, schiudendo più o meno, l'apertura obliqua e permettendo quindi più abbondante afflusso di gas alla lampada (v. fig. 459).

Se si vuole un termoregolatore di questo tipo, che regoli temperature di 20°-24°, lo spazio regolante deve contenere cloruro di etile; se di 30°-40°,

esso deve contenere dell'etere. Per le colture in gelatina si richiede la prima condizione, per quelle in agar, in brodo, ecc., la seconda.

b) Termostato di Schribaux e termoregolatore di Roux.

Tipo dei termostati ad aria è il *termostato di Schribaux* con *termoregolatore di Roux.*

È una specie di armadio, dal cui fondo s'inalzano tante canne metalliche, le quali in unica fila traversano l'interno fino al tetto, rimanendo accostate alle pareti laterali e posteriore. Esse mettono in comunicazione lo spazio sottostante al fondo del termostato con una cameretta posta sopra il tetto e comunicante per un foro centrale con l'esterno. Parecchie fiamme di gas, protette da un mantello metallico sottoposto al fondo della stufa, ardono riscaldando l'aria: l'aria calda ed i prodotti della combustione, tendendo a sfuggire in alto dall'apertura esistente nel tetto, passano dentro le canne di metallo, che si riscaldano alla lor volta ed irradiano calore nell'interno.

Il *termoregolatore di Roux*, tutto costruito di metallo, è collocato dentro la stufa presso una delle pareti laterali. Ve ne sono diversi modelli: uno è quello ad **U**. Una lamina di acciaio ed una di zinco sono saldate ed incurvate ad **U**: una delle branche è fissata alla parete del termostato, l'altra rimane libera, e porta saldata una spranghetta che, traversando la parete del termostato, termina esternamente con un bottone piano. All'esterno della stessa parete si vede orizzontalmente disposto un manicotto metallico che ha una base chiusa e l'altra forata e che porta in basso due tubi, uno per l'accesso, l'altro per l'uscita del gas. Dentro al manicotto e parallelo ad esso vi è un cilindro cavo, con ambo le basi forate, delle quali una è saldata concentricamente alla base perforata del manicotto, mentre l'altra resta libera di contro alla base chiusa di questo; sicchè lo spazio interno del cilindro e quello compreso fra il cilindro e il manicotto comunicano fra loro per mezzo dell'orificio della base libera del cilindro medesimo. Il tubo di afflusso si apre nell'interno del manicotto: quello di efflusso, attraversata la parete di questo, riesce nel cilindro interno. Un bastoncino metallico, scorrevole dentro il cilindro, cui è fissato per mezzo di un saltaleone, esce per un tratto dal foro del manicotto, e poggia sul bottone piano su ricordato, restandovi leggermente compresso per la spinta del saltaleone: il bastoncino porta all'estremità opposta una valvola conica atta a chiudere od aprire, ed aprire in varia misura, l'orificio di comunicazione fra l'interno del cilindro e lo spazio circostante. Il gas dunque entra in questo spazio, nel manicotto, poi per il detto orifizio passa nel cilindro, e da questo va per il tubo d'efflusso alla fiamma. Il manicotto è fornito inoltre di una vite, mediante la quale si può fare la prima regolazione a mano.

La regolazione automatica si fa per gli effetti del diverso coefficiente di dilatazione dei due metalli onde il ferro di cavallo è composto. La lamina esterna è fatta di zinco, l'interna di acciaio, che è meno dilatabile dello zinco. Se la temperatura nell'interno sale, l'estremità della branca mobile si avvicina alla branca fissa, ed il bastoncino, sollecitato dalla spinta del saltalcone cui è connesso, segue il movimento della branca mobile, mantenendosi a contatto col bottone piano, quindi accosta la valvola conica all'orificio d'accesso

del gas al cilindro, diminuendone la portata; al contrario, se la temperatura discende, la branca mobile si allontana dalla fissa ed il bastoncino viene compresso in senso contrario alla spinta del saltaleone, quindi la valvola si scosta dall'orificio e l'afflusso del gas aumenta.

c) Termostato Sartorius e termoregolatore omonimo.

È una stufa a petrolio, provvista di un buon termoregolatore, utilissima nei luoghi dove non si può avere del gas. L'intercapedine è piena d'acqua,

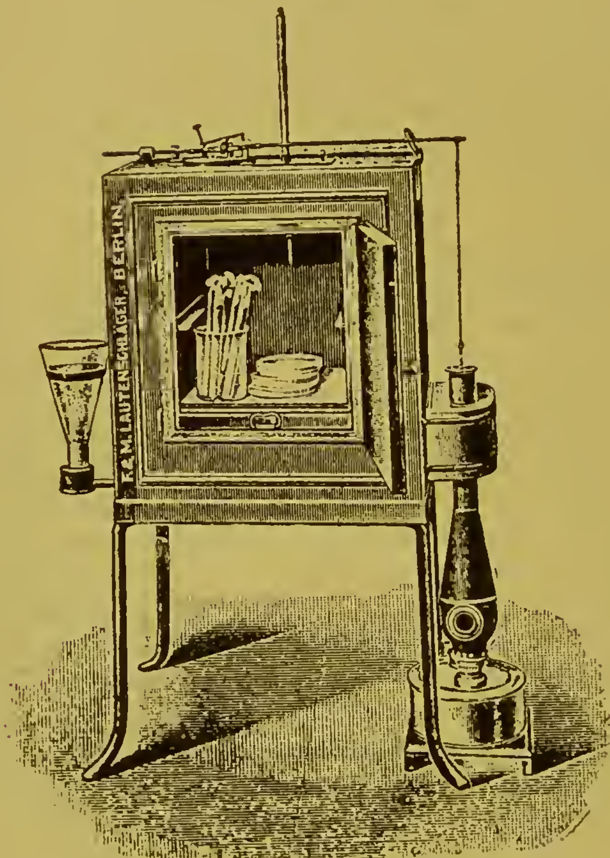


Fig. 460. — Termostato Sartorius.

come in altri termostati. La lampada a petrolio è collocata di fianco, al di sotto di una specie di cassetta metallica, che sporge in fuori di una delle pareti laterali del termostato ed è verticalmente attraversata da un tubo cilindrico, pure di metallo, aperto in alto, e destinato a ricevere nella sua parte inferiore l'estremità del tubo di vetro della lampada. Con questo tubo metallico è connesso a **T** un altro tubo, che penetra e si dirama nell'intercapedine; così l'acqua vien mantenuta calda per mezzo del calore apportatole dai prodotti della combustione e dall'aria chiusa nel detto sistema di canali. Sull'apertura superiore del tubo verticale viene a battere un mobilissimo coperchietto piano, appeso per una catenella al braccio lungo di una leva, che trovasi aggiustata in bilico sul tetto del termostato. Presso al suo fulcro la

leva è così costruita e munita di tal congegno, che, maneggiando una vite, si può abbassare il coperchietto fino a che poggi appena sull'orlo del tubo, oppure sollevarlo quanto si vuole, a passi minimi. Lo stesso congegno acconsente in maniera simile ai lievi inalzamenti od abbassamenti di uno stiletto verticale, sul quale è poggiato, e che, attraversando il tetto del termostato, cade sul centro di un tamburo a membrana elastica, posto nell'interno.

Le distensioni e contrazioni che questa membrana subisce per effetto dei mutamenti di temperatura si traducono in sollevamento e abbassamento del coperchietto. Una volta ottenuta la temperatura che si vuole, p. es. di 37-38° C., si solleva il coperchietto, tanto appena da lasciare libera via ad una piccola parte dell' aria calda e dei prodotti della combustione. Se la temperatura nell'interno scende, il coperchio si abbassa, e chiudendo l'apertura del tubo, fa sì che il calore sia utilizzato per accrescere la temperatura dei canali di riscaldamento, quindi quella dell'acqua e dell'interno del termostato. Inversamente, se la temperatura cresce, il coperchio s'inalza producendo l'effetto opposto a quello di prima.

La parete opposta a quella cui corrisponde la lampada è fornita di un ordegno destinato a mantenere convenientemente umido l'interno della stufa. Esso è composto di un matraccio conico chiuso con un tappo di sughero compatto, il quale porta, opposte in diametro, due tacche incise per lungo; nelle due tacche si adattano i due capi di un lungo e grosso lucignolo, e col tappo così preparato si chiude il matraccio, dopo avervi versato dell'acqua. Il matraccio è capovolto col collo dentro una vaschetta circolare, comunicante con una scatola a pareti basse, che contiene una pezzuola di tela distesa sopra una rete metallica: su questa pezzuola poggia l'ansa del lucignolo, che, trasportando l'acqua per capillarità, ne la imbeve, e la trasforma in una superficie evaporante. La cassetta è collocata sotto il fondo bucherellato del termostato, così che di tutto l'ordegno non si vede esternamente altro che il matraccio capovolto nella vaschettina circolare (v. fig. 460).

VI. — OSSERVAZIONE DELLE COLTURE SVILUPPATE.

Le colture si tengono in termostato quanto è necessario perchè siano bene sviluppate: della maggior parte dei batteri patogeni si hanno a 37-38° rigogliose colture dopo 18-24 ore, laddove a 22° non si ottengono in generale colture abbondanti se non dopo circa 3 giorni.

1) **Osservazione dei caratteri colturali.**

Si osservano le colture sviluppate per riconoscerne i caratteri, e per assicurarsi della loro purezza; ciò fatto, si può iniziare o continuare lo studio delle specie che le hanno prodotte, seguendo i metodi che più si confanno ad ogni caso.

Avanti di aprire i tubi o altri recipienti o le scatole Petri, in cui sono

cresciuti dei germi, bisogna notare i caratteri delle colture sviluppate. Ecco gli avvertimenti principali.

Delle *colonie* nate nelle colture a piatto si notano la grandezza, la forma, il colore, la trasparenza od opacità, la lucentezza, la levigatezza o l'asperità o la rugosità o altro aspetto irregolare della superficie, l'eventuale presenza di una porzione centrale ben distinta dal resto della colonia (nucleo della colonia), la regolarità o irregolarità del contorno (rotondo, ondulato, lobato, sfrangiato, provvisto di propaggini filiformi raggiate o ramificate o digitate), il grado di aderenza al terreno, l'eventuale presenza di fittoni penetranti in esso, la consistenza, quale si può apprezzare toccandole con un ago di platino. Per le colonie nate in gelatina occorre pur notare se questa è fluidificata o no.

I caratteri nominati si notano ad occhio nudo, ed in parte si confermano con l'osservazione microscopica a 60-70 diametri d'ingrandimento: questa inoltre permette di rilevare altri caratteri, che sfuggono ad occhio nudo, e che sono la granulosità, la presenza di solcature, la precisione o l'indeterminatezza del contorno. Inoltre il colore delle colonie che si osserva al microscopio spesso non ha che fare con quello che si vede a occhio nudo. Il fin qui detto vale principalmente per le *colonie superficiali;* le colonie *profonde* sono in generale più piccole, e non presentano di solito importanti caratteri distintivi.

Nelle *colture in brodo* si nota se vi è intorbidamento o pur no, ed in caso positivo se è forte o debole, se vi è sedimento al fondo e di che aspetto e colore (fioccoso, polverulento, granelloso; biancastro, grigio, giallastro, ecc.); se vi è pellicola in superficie, e se è continua o discontinua, spessa o sottile, liscia o rugosa.

Negli *strisciamenti su agar* si notano gli stessi caratteri che sono stati ricordati per le colonie: solo bisogna aggiungere se la patina è continua o discontinua. L'acqua di condensazione dimostra ordinariamente gli stessi caratteri della brodocoltura.

Nelle *infissioni in gelatina*, si nota se il nastrino sviluppato lungo la linea d'infissione è continuo o formato da una filza di piccole colonie, se è liscio o dentellato o provvisto di barbe; inoltre se vi è sviluppo in superficie, e quale è il suo aspetto, che può essere sempre descritto come se si trattasse di una colonia (v. fig. 461).

La gelatina può essere fluidificata, debolmente o intensamente, rapidamente o lentamente, in forma di coppa, di cono od imbuto, di sacco semplice o di sacco strozzato, di cilindro (v. fig. 462).

Negli *strisciamenti su patate* si fanno le stesse osservazioni dette per quelli su agar.

Nelle *colture in latte* si nota se la reazione è mutata, se vi è coagulazione o rischiaramento, o tutt'e due le alterazioni. Riscaldando le colture in latte a 100°, secondo l'indicazione di Biffi, si può ottenere un nuovo criterio differenziale, giacchè quelle di alcuni germi dopo il riscaldamento coagulano, altre rimangono fluide.

Dopo fatte le osservazioni sommariamente esposte, si può procedere all'esame microscopico dei germi, ed alla preparazione di altre colture prelevando il materiale dalle colture sviluppate.

Per il prelevamento del materiale dalle colture aerobiche e da quelle anaerobiche, le quali furono allestite come se fossero aerobiche, basta to-

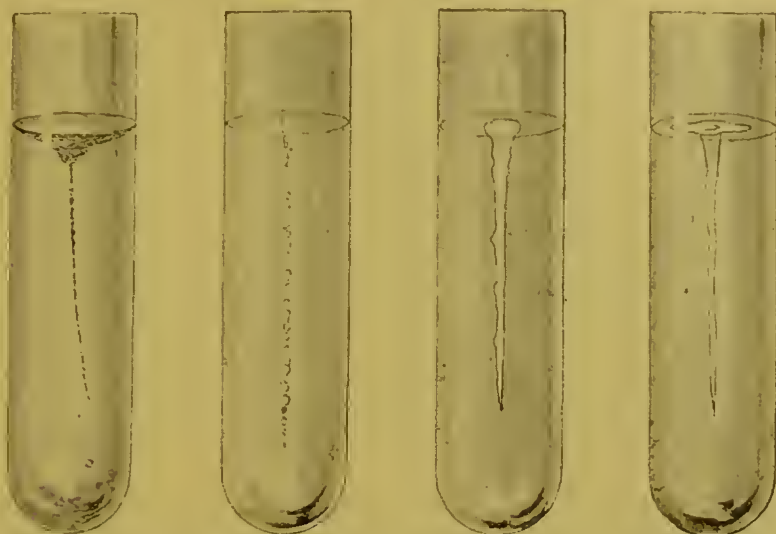
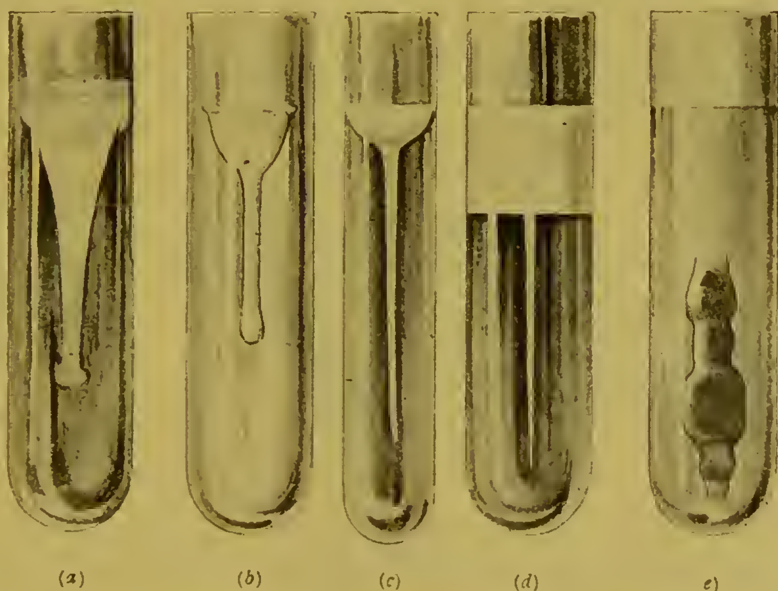


Fig. 461. — Vari tipi d'infissione in gelatina, senza fluidificazione.

gliere il tappo ai recipienti, senza più altro, perchè la massa batterica si trovi immediatamente sotto l'ansa di platino o la punta d'una pipetta. Non



(a) (b) (c) (d) e)

Fig. 462. — Vari tipi di fluidificazione della gelatina:
(a) a cono; (b) ad imbuto: (c) a coppa: (d) a cilindro: (e) a sacco strozzato.

così per alcuni tipi di colture anaerobiche, le quali vanno aperte con vari espedienti.

Le provette di Gruber si aprono facendo con la lima una tacca sulla

parete, a conveniente distanza dal livello del liquido; sulla tacca si poggia l'estremità arroventata di un carboncino Berzelius (1), che ha forma di bacchetta, e soffiandovi sopra dolcemente, si mantiene incandescente, finchè d'un colpo la tacca diventi una rottura circolare o quasi; si butta allora il pezzo superiore della provetta, e questa si chiude subito con un tappo di ovatta, tolto lì per lì da un tubo sterilizzato.

Dalle colture ad alto strato solide il materiale si preleva dopo aver estratto il cilindro e fattolo scivolare in una scatola di Petri sterilizzata. Si stacca il cilindro dalle pareti del tubo per mezzo di un lungo e robusto ago di platino, si riscalda cautamente alla fiamma il fondo della provetta in modo che venga fluidificato appena un sottile strato esterno del terreno, e poi, passato l'orlo della provetta alla fiamma, s'introduce fra le due metà di una scatola Petri, dischiuse da un lato. Inclinando il tubo, e se occorre anche tenendone il fondo presso o dentro la fiamma, si ottiene lo scivolamento del cilindro. Questo si affetta con coltello sterilizzato, e da ciascuna delle colonie presenti in ogni disco si possono fare preparati ed altre colture.

Dalle colture liquide ad alto strato bisogna estrarre il liquido occludente, mediante pipette sterilizzate; è meglio adoperare delle pipette di sicurezza, costruite secondo il tipo delle siringhe di Stroschein (v. più oltre, Dimostrazione delle proprietà patogene).

2) Numerazione delle colonie nelle colture a piatto.

Le colture a piatto presentano colonie batteriche isolate; spesso occorre, per vari scopi, di contarle: così nell'esame dell'acqua, nelle esperienze di batteriolisi *in vitro*, nello studio dei disinfettanti. La numerazione delle co-

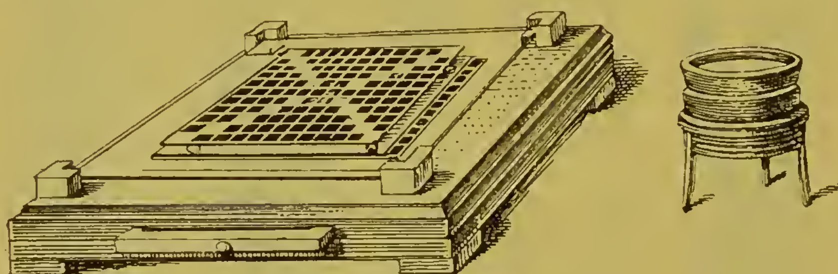


Fig. 463. — Contacolonie di Wolffhügel.

lonie si fa ad occhio nudo, aiutato, se bisogna, da una lente a mano, oppure col microscopio.

La numerazione delle colonie ad occhio nudo si fa con apparecchi detti *contacolonie*: il più usato è *quello di Wolffhügel* (v. fig. 463). Esso consta di una lastra quadra di vetro centimetrato, con lato di 12 cm.; i

(1) Il carboncino Berzelius preparasi così: si mescolano 50 parti di nerofumo, 50 di gomma arabica, 20 di gomma adragante e 20 di benzoino, e si sciolgono in acqua in maniera da formarne una pasta che si foggia a lapis.

quadratini disposti in diagonale sono divisi ciascuno in nove quadratini eguali più piccoli. La lastra poggia sopra quattro dadi convenientemente intaccati ad angolo retto per riceverlo, e fissati ad una tavola quadrata su cui trovasi una lastra di vetro nero. La scatola Petri s'interpone fra le due lastre, sicchè le colonie da contare spicchino bene sul fondo scuro. Si contano le colonie comprese in parecchi cmq., aiutandosi con la lente, se occorre: poscia si fa la media numerica delle colonie corrispondenti ad un cmq. e per essa moltiplicasi il numero di cmq. che formano la superficie della scatola. Il prodotto così ottenuto indica approssimativamente il numero delle colonie sviluppate in tutta la piastra: e se, quando fu allestita la coltura, si tenne conto della quantità di materiale seminato, esso dà anche il numero dei batteri contenuti in detta quantità. Ciò facendo, si ammette implicitamente — ed è ormai tacita convenzione universale — che ogni colonia sia originata da un solo germe, il che a rigore non è sempre ammissibile.

Facciamo un esempio, e supponiamo di aver seminato cmc. 0.1 di un liquido batterifero in agar, dentro una scatola del diametro di 10 cm., quindi della superficie di $3.14 \times \left(\frac{10}{2}\right)^2 = 78.50$ cmq. Eseguiamo la numerazione, nel modo già detto, e si trovi una media di 10 colonie per cmq. Il numero totale delle colonie cresciute nella piastra sarà allora di

$$10 \times 78.50 = 785.$$

Questo numero si riferisce a cmc. 0.1 del liquido seminato, il quale dunque conteneva in 1 cmc. $785 \times 10 = 7850$ batteri.

Quando le colonie son troppe e l'occhio non può contarle con sicurezza nello spazio di un cmq., allora si contano quelle comprese nei quadratini minori della diagonale, che sono di $\frac{1}{9}$ di cmq. Con facile calcolo si deduce la media per cmq. che serve per il computo definitivo.

Il numero dei quadratini da scorrere per contare le colonie dipende dal maggiore o minor numero di queste. Se sono diecine, ben si possono contare tutte quante. Se centinaia, si può seguire una qualche norma sulla scelta dei quadratini: p. es. si contano le colonie comprese nei quadratini che formano file alterne dall'alto al basso, o da destra a sinistra: se son migliaia, bisogna accontentarsi di contare le colonie dei quadratini disposti in due o tre file orizzontali e in altrettante verticali. Quando le colonie siano più di 10-15-20 mila, si rinunzia a contarle ad occhio nudo; e si ricorre allora a colture seminate con minor quantità di materiale, o al metodo della numerazione microscopica.

Il *contacolonie di Lafar* (v. fig. 464) ha una lastra di vetro divisa in 18 settori eguali, tagliati da quattro cerchi concentrici, sempre più vicini fra loro dal centro alla periferia: i risultanti spazi quadrangolari, in tre settori che siano distanti di $\frac{1}{3}$ di cerchio fra loro, sono suddivisi ciascuno da due tratti diagonali. Facendo uso di questo contacolonie, bisogna naturalmente contare le colonie comprese in più settori interi, scelti con una certa regola: si fa la media per settore, e questa si moltiplica per 18, numero totale dei settori.

Il *contacolonie di Heyroth* (v. fig. 465) è di costruzione più complessa. Esso è montato sopra uno stativo somigliante a quello di un microscopio semplice: un tavolinetto rotondo, girevole, destinato a ricevere la scatola Petri, e poco più sopra un disco recante una finestrina, in corrispondenza della quale si possono fissare a piacere delle lastre con aperture quadre di cmq. 1, $^1/_4$, $^1/_9$; al di sopra una lente a mano; al di sotto del tavolinetto girevole uno specchio da microscopio.



Fig. 464. — Contacolonie di Lafar.

Al disco con le lastre può essere sostituito un cerchio con dieci raggi, fra i quali restano compresi altrettanti settori.

Il modo di servirsi di siffatto apparecchio è simile all'uso dei contacolonie di Wolffhügel e di Lafar.

La *numerazione microscopica* si fa quando siano parecchie diecine di migliaia, fino a qualche centinaio di migliaia le colonie da contare.

Si procede nel seguente modo:

Si divide il fondo della scatola Petri in tanti quadrati eguali, tracciando due serie di linee parallele in croce. Si pone la scatola sul tavolino del microscopio, facendo uso di un sistema ottico a piccolo ingrandimento. per es. l'obbiettivo a secco 2 Koristka e l'oculare Huyghens 3, osservando la regola della distanza di 16 cm. fra l'una e l'altra lente (v. pag. 796). Si scorre ordinatamente la scatola sotto l'occhio, in modo che ogni volta vi capiti un nuovo quadratino, e si contano le colonie comprese in ciascun campo microscopico: la numerazione può agevolarsi mediante vetrini quadrettati interposti fra la collettrice e la frontale dell'oculare. Bisogna contare tanti campi

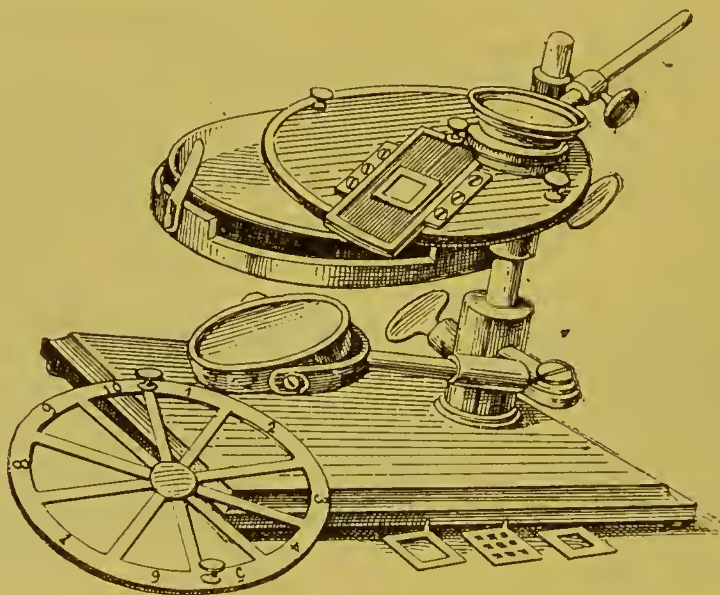


Fig. 465. — Contacolonie di Heyroth.

microscopici quanti sono i quadratini; e si cerca la media del numero delle colonie per campo microscopico. Si determina, se già non si è fatto prima, la superficie di questo campo mediante un obbiettivo micrometrico (v. pag. 798), e poi il numero dei campi compresi nella superficie della scatola; per questo numero moltiplicando la media ottenuta, si conosce quante colonie trovansi nella piastra. Facciamo un esempio.

Col su detto sistema ottico si ha un campo di mmq. 3.7994; la superficie di una piastra avente il diametro di 9 cm. è di cmq. 63.5850, quindi comprende 1620 campi microscopici. La media delle colonie contate sia di 20 per campo microscopico: il numero totale delle colonie nate sulla piastra sarà di

$$1620 \times 20 = 32400.$$

Se il numero delle colonie da contare è di parecchie centinaia di migliaia, fino a qualche milione, si può adoperare per la numerazione microscopica il *disco numerante di Heim*, servendosi anche in questo caso di un sistema a piccolo ingrandimento. È un vetrino che s'interpone fra le due lenti dell'oculare e porta segnati dei cerchi concentrici ad eguale distanza, tagliati da otto raggi ad eguale angolo. Secondo l'addensamento delle colonie, si contano quelle che son comprese nel cerchio minore, o nei cerchi intermedi, o nel cerchio maggiore: la divisione in settori agevola e rende l'operazione più sicura.

La superficie di ciascun cerchio è nota, essendo stata determinata con l'obbiettivo micrometrico. Dopo aver contate le colonie comprese in un dato cerchio, in diversi punti della piastra, se ne fa la media; si calcola il numero dei cerchi uguali a quello usato che sono compresi nella superficie della scatola; per questo numero si moltiplica la media, e si conosce così quante colonie son nate nella coltura a piatto.

3) Numerazione di tutti i germi contenuti in un liquido.

I metodi di numerazione fin qui descritti permettono di conoscere solo il numero dei germi vitali, cioè capaci di moltiplicarsi e dare origine alla formazione di colonie.

Ma può anche occorrere di conoscere il numero totale dei batteri contenuti in un liquido, per esempio in una sospensione, siano essi vivi o morti: in tal caso si ricorre al metodo che Wright ha escogitato per determinare con sufficiente approssimazione gl'individui batterici che si trovano nell'unità di volume de' vaccini wrightiani.

La sospensione batterica, in cui si vuol fare tale determinazione, si riscalda anzi tutto per un'ora a 60°, allo scopo di poterla maneggiare senza pericolo.

Intanto si prende un contaglobuli Thoma-Zeiss, e si conta, nel modo consueto per l'uso di questo apparecchio, il numero dei globuli rossi contenuti in un mmc. di sangue di una persona o di un animale, p. es. di un coniglio: si nota il numero trovato. Si pulisce ben bene e si asciuga la pipetta, indi si ripunge lo stesso individuo di prima, e si procede come per fare una seconda numerazione, salvo che questa volta, invece di usare come diluente la soluzione salina, si usa la sospensione batterica (che natural-

mente dev'essere stata fatta in soluzione fisiologica), versata in piccola quantità dentro lo scavo di un blocchetto di vetro. Si agita ben bene la pipetta, si lascia cadere la prima porzione di liquido, poi si depongono 3-4 piccole gocce sopra altrettanti portoggetti ben puliti, e si lasciano essiccare all'aria. I preparati si colorano con la tionina fenica; indi si osservano ad immersione, scorrendo diversi campi e notando, per ogni campo, da una parte il numero delle emazie, dall'altra quello dei batteri. Si fa in ultimo la somma di tutte le emazie e di tutti i batteri contati.

Per conoscere quanti germi esistono in un mmc. della sospensione, si moltiplica il numero delle emazie, trovato nella numerazione preliminare, per il rapporto fra quello dei batteri contati e quello delle emazie contate nei preparati colorati, e per il rapporto volumetrico in cui sono stati mescolati il sangue e la sospensione batterica. In formula si può dunque scrivere che il numero dei batteri presenti in un mmc. di sospensione è

$$N = E \times \frac{b}{e} \times R,$$

dove E rappresenta il numero di emazie contenute in un mmc. di sangue, $\frac{b}{e}$ ed R rispettivamente i due rapporti su detti.

Facciamo un esempio:

Si contino i globuli rossi in un uomo sano, e si trovi $E = 5{,}000{,}000$.

Si mescolino, nella seconda prova, il sangue e la sospensione batterica nel rapporto $R = \frac{1}{100}$.

All'osservazione dei preparati colorati si trovi $b = 460$, $e = 100$, onde $\frac{b}{e} = \frac{460}{100} = \frac{23}{5}$.

Si avrà allora che in un mmc. della sospensione vi sono

$$N = 5{,}000{,}000 \times \frac{23}{5} \times \frac{1}{100} = 230{,}000 \text{ batteri,}$$

ciò che corrisponde a 230 milioni per cmc.

C. — DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA DEI BATTERI AGLI AGENTI FISICI E CHIMICI.

Norme generali.

Si può saggiare la resistenza delle *forme vegetative* e quella delle *spore*. Per siffatti esperimenti bisogna far uso di colture fresche, allestite nel terreno di coltura più propizio o allo sviluppo delle forme vegetative o a quello delle spore batteriche che si vogliono studiare. Per le forme vegetative si adoperano, salvo casi speciali, patine di agarcolture sviluppate a 37° in 16-18 ore; per le spore si usano agarcolture o colture su patate, secondo la specie batterica, sviluppate a 30° per 3 giorni. Se si ha una sospensione di bacilli con spore, per distruggere i primi, lasciando vitali le seconde, si riscalda la sospensione a 80° per 2 minuti. Ottolenghi ha rilevato l'opportunità di usare

agarcolture che, dopo avvenuta la sporificazione, siano conservate per uno o due mesi al buio, a temperatura di stanza: le differenze d'età fra le varie spore vengono così praticamente a scomparire.

Del materiale si prepara una sospensione densa ed uniforme in acqua distillata sterilizzata; poi si centrifuga per rimuovere, se vi sono, quei fini grumetti formati dai germi che non si sono sparsi nel liquido. Oppure si passa per un filtro di carta, che sia stato sterilizzato sull'imbuto e che si bagna con acqua distillata sterile prima di versarvi la sospensione. Nella sospensione in tal modo preparata si intingono dei fili di seta sgrassata, sterilizzati in autoclave, o delle palline di vetro del diametro di un terzo di cm., ben pulite e terse, sterilizzate nella stufa a secco.

I fili di seta si prendono con pinzette comuni, le palline con pinzette le cui branche finiscano a mo' di cucchiaini, con le facce concave a riscontro: le une e le altre vanno sempre sterilizzate alla fiamma, volta per volta, prima di prender l'oggetto e dopo averlo preso.

Le palline o fili di seta estratti dalla sospensione si fanno prima scolare e poi si mettono ad asciugare sopra un disco di carta bibula, adattato al fondo di una scatola di Petri sterilizzata; indi si passano in un'altra scatola di Petri, la quale si pone in un essiccatore a cloruro di calcio anidro. Vi si lasciano tanto che siano ben asciutti, in generale 12-16 ore, non oltre; dopo di che sono pronti per l'esperimento.

Tutte queste operazioni possono variare nei particolari, secondo la natura dei germi, gli scopi che si prefigge l'esperimentatore e le condizioni che egli s'impone; così, per esempio, talora si usano, per qualche studio speciale, le colture stesse, o le sospensioni tali e quali, oppure le sospensioni mescolate con varie sostanze organiche, come siero, muco, urina, ecc., ovvero sospensioni fissate a strisce di tela o di carta bibula, a crini di cavallo, ecc. Ma quando non vi siano queste od altre ragioni speciali, la resistenza dei batteri e delle spore va studiata secondo le esposte norme generali.

Resistenza al calore secco.

Bisogna servirsi di una stufa a secco con sul tetto un foro, chiuso da un tappo di sughero compatto e per il quale possa essere introdotto l'oggetto inquinato nel momento in cui il termometro segna la voluta temperatura.

Si tengono pronti parecchi tappi di sughero compatto, uguali a quello testè ricordato, salvo che in ciascuno di essi trovasi infissa una pinzettina a pressione, per mezzo di un manico a punteruolo di cui dev'essere provvista: possono servire a tale scopo anche le così dette pinze froebeliane.

I fili o le palline s'involgono in un quadratino di garza sterilizzata, questo si afferra fra le branche di una pinzettina, e, quando il termometro segna la temperatura desiderata, al tappo semplice nel tetto della stufa si sostituisce il tappo con la pinzetta che porta il sacchettino di garza, e vi si tiene finchè non sia trascorso il tempo stabilito. Con ogni precauzione di sterilità, i fili si tolgono dal sacchettino, e si introducono in provette contenenti brodo nutritivo, oppure si strisciano sopra dell'agar solidificato dentro scatole di Petri.

Si possono così fare esperienze a varie temperature e per varia durata d'esposizione.

Si può anche procedere in altro modo.

Gli oggetti inquinati si pongono in provette sterilizzate, bene asciutte e chiuse con tappo di gomma, e le provette s'immergono in bagnomaria a temperatura costante.

Per temperature fino a 100° si usa, secondo A. Meyer, Balfour Stewart ed altri, un bagnomaria a doppia parete, con coperchio rivestito d'amianto. Nell'interno si versa dell'acqua, nell'intercapedine una sostanza variabile secondo la temperatura a cui si vuole mantenere l'acqua: all'intercapedine è annesso un apparecchio a ricadere per la condensazione dei vapori della sostanza che vi si mette.

Così, secondo A. Meyer, si adopera:

Cloroformio per la temperatura di . . . . 60° C.
Alcool metilico 3 + alcool etilico 7 per la temperatura di 70°
Alcool etilico per la temperatura di . . . . 75°
Alcool etilico 7 + alcool propilico 4, oppure benzolo (Balfour Stewart) per la temperatura di . . . . 80°
Alcool etilico 1 + alcool propilico 8 per la temperatura di 90°
Acqua per la temperatura di . . . . 97-100°

Per esperienze da eseguirsi sopra ai 100°, si possono adoperare le seguenti sostanze; però in vece di acqua bisogna mettere dell'olio nell'interno del bagnomaria. Si può dunque usare

Xilolo per la temperatura di . . . . 136°
Anisolo » » . . . . 150°
Cumolo » » . . . . 161°
Anilina » » . . . . 180°
Naftalina » » . . . . 200°

Trascorso il tempo stabilito per l'esposizione ad una data temperatura, si allestiscono coi fili o colle palline le colture nel modo spiegato dianzi.

Resistenza al calore umido.

Per saggiare la resistenza dei batteri al vapore fluente a 100°, si adoperano degli apparecchi i quali non sono altro che pentole di Koch, in cui la sfuggita del vapore avvenga per una sezione non troppo grande, e in alto portino uno o più fori per l'introduzione dei tappi montati col materiale inquinato nel modo or ora descritto. Può servire, per esempio, l'apparecchio della fig. 466, il quale non ha propriamente un coperchio allontanabile, ma un tetto forato ed attraversato dal termometro e da un tubetto di vetro per l'uscita del vapore: sulla parete in alto si trova un foro circolare per introdurvi il materiale: essa quindi resta chiusa dal tappo di sughero munito della pinzetta cui si affida il materiale.

Nell'eseguire tali esperimenti, bisogna tener presente che un lieve raffreddamento si produce nel vapore allorchè si toglie un tappo per sostituirne un altro; per ovviare a questo inconveniente sono state costruite delle pentole fornite di un manometro, il quale serve a dare l'indicazione del momento opportuno per compiere la breve operazione; si attende cioè

che il vapore abbia una lieve pressione di circa un centimetro di colonna d'acqua.

Si possono anche, invece delle pentole di Koch modificate, adoperare dei semplici matracci di Erlenmeyer o palloni di vetro, contenenti dell'acqua, protetti da una camicia d'amianto, e congegnati in modo che gli oggetti inquinati possano comodamente introdursi nello spazio pieno di vapore.

Per lo studio della resistenza al *vapore sotto pressione* si devono usare delle autoclavi, al cui coperchio o alla cui parete sia connessa, per mezzo d'un tubo, una piccola scatola di robusto metallo, munita di due chiavette, una per la comunicazione con lo spazio occupato dal vapore nell'autoclave, l'altra per la comunicazione con l'esterno; deve essere inoltre fornita di termometro, e possedere un foro con adatto congegno per introdurvi rapidamente il tappo montato, e tenervelo ben compresso.

Resistenza alla luce solare.

Per questo genere d'esperienze conviene far aderire la sospensione batterica a un oggetto che permetta l'azione dei raggi solari ugualmente su tutta la massa batterica. I fili e le palline in questo caso non si prestano, perchè in essi rimane sempre un tratto meno esposto. Si adoperano dunque dei vetrini coproggetti, dimezzati col diamante, puliti e tersi, e sterilizzati. Si spande la sospensione batterica sopra una loro faccia; parecchi mezzi vetrini così preparati si pongono ad asciugare in una scatola di Petri sterilizzata.

Collocando i vetrini in capsulette di vetro sterilizzate, la massa batterica si può esporre tutta quanta egualmente ai raggi solari diretti oppure alle varie luci monocromatiche, ottenute con filtri di vetro colorato oppure con prismi di refrazione, o alla luce diffusa o a varie luci artificiali, come luce elettrica, raggi Röntgen, ecc., oppure all'azione del radio. Qualora si voglia scindere l'azione dei raggi luminosi da quella del calore, nella luce solare ed in alcune luci artificiali, la capsuletta contenente il vetrino batterifero s'introduce in un filtro, che trattenga solo i raggi calorifici: ciò si ottiene facendo uso di una scatola cilindrica di vetro, in cui passi una corrente d'acqua fredda o sia contenuta una soluzione di allume.

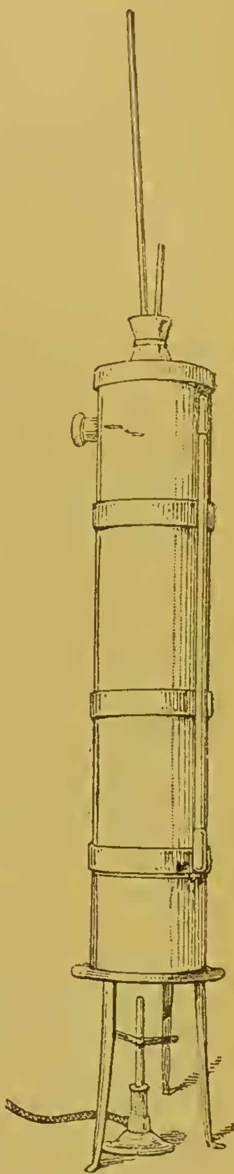


Fig. 466. — Stufa per la dimostrazione della resistenza di batteri al vapore fluente.

Per dimostrare l'azione battericida della luce solare diretta il Buchner fece questa prova: sul fondo di una scatola di vetro incollò delle strisce di carta nera, poi versò dell'agar copiosamente seminato col *Bact. coli* o con altre specie, espose al sole il fondo coperto con le strisce, per un'ora fino ad un'ora e mezzo, quindi portò la scatola in termostato: le colonie si svilupparono soltanto nelle parti scoperte dell'agar.

Resistenza all'essiccamento.

Gli oggetti inquinati, dopo che sono stati asciugati ed essiccati appena quanto basta per togliere quelle tracce d'acqua che circondano i corpi batterici, si distribuiscono in tante provettine, le quali si ripongono in un essiccatore sopra cloruro di calcio anidro tenuto all'oscuro: di tanto in tanto se ne toglie una provetta, e si allestiscono le colture.

Un saggio consimile si può fare tenendo le provette non in essiccatore, ma all'aria, sempre però al buio. I risultati che si ottengono coi due metodi sono assai diversi.

In tutte queste esperienze bisogna aver cura di mantenere una temperatura costante.

Resistenza alle basse temperature.

Gli oggetti inquinati, chiusi in provette od altri adatti recipienti sterilizzati, si espongono all'azione di miscele frigorifere o di gas liquefatti nell'atto di volatilizzare. Così può ottenersi una temperatura di —80° mescolando, in un vaso a ciò, anidride carbonica solida ed etere; di —190°, facendo volatilizzare l'aria liquida.

Resistenza alla pressione.

Gli oggetti inquinati, o i terreni di coltura appena seminati, si chiudono in robusti apparecchi metallici, in cui si può comprimere dell'aria o varie sorte di gas.

Dopo l'operazione si allestiscono le colture degli oggetti inquinati: i terreni di coltura già precedentemente seminati si pongono senz'altro in termostato.

Resistenza agli agenti chimici.

Questi possono trovarsi allo *stato gassoso* oppure in *soluzione*.

Per lo studio della resistenza alle *sostanze gassose* si adoperano delle cassette di legno ermeticamente chiuse, con una parete di vetro, munite di termometro: esse hanno un foro per introdurvi gli oggetti inquinati, involti in garza sterilizzata, mediante un tappo fornito di pinzetta; un altro foro per l'immissione del gas, eventualmente un terzo per l'uscita. Il fondo della cassetta è di metallo, sicchè può essere riscaldato per mantenere la temperatura voluta. La cassetta così costruita può anche servire per saggiare l'azione dei vapori di sostanze volatili: queste perciò si versano in larghi recipienti, che permettono un'ampia superficie evaporante; i recipienti si posano dentro la cassetta.

Apparecchi assai più perfetti sono stati immaginati dal Rubner per lo studio dell'azione di sostanze gassose in presenza di vapore d'acqua saturo a temperature inferiori a 100°: essi quindi sono provvisti, oltre che dei congegni per l'immissione del vapore d'acqua e del gas, anche di strumenti per mantenervi una pressione inferiore all'atmosferica di quanti millimetri si vuole. Essendo apparecchi troppo speciali e complessi, è superfluo farne qui la descrizione: basta l'averli ricordati.

Per lo studio della resistenza alle *soluzioni*, queste devono essere preparate con sostanze pure, in acqua perfettamente distillata, o in altro liquido puro, secondo le rigorose norme della chimica. Nell'eseguire questo genere di esperienze, bisogna curare la costanza della temperatura delle soluzioni, la quale, tranne casi speciali, suol mantenersi a 18°: a mantenere la temperatura costante serve il termostato ad acqua di Ostwald, con termoregolatore a toluolo, con serpentino d'acqua fredda nel fondo e con agitatore a palette.

Quando si vuole studiare il grado di resistenza di una specie batterica rispetto a diverse sostanze chimiche, queste si devono saggiare sempre in soluzioni equimolecolari; lo stesso precetto deve osservarsi quando si vuol comparare il potere disinfettante di due sostanze verso una medesima specie batterica.

Gli oggetti inquinati s'immergono dunque nella soluzione preparata e contenuta in vaschettine di vetro, provviste di coperchio con incastro smerigliato; trascorso il tempo stabilito, si ritirano dalla soluzione e si lavano in acqua distillata. Per rimuovere le tracce di sostanza ancora aderenti, gli oggetti si immergono in una soluzione d'altra sostanza capace di neutralizzare il disinfettante.

Per neutralizzare i sali dei metalli pesanti, come p. es. il sublimato, si adopera il solfuro d'ammonio, in soluzione dal 3 al 5 % allorchè si sperimenta con delle spore, al 0.3 % se si sperimenta con forme vegetative.

Per neutralizzare le basi adoperasi una debole soluzione di acido acetico.

Per neutralizzare gli acidi, il cloro, il bromo e la formaldeide adoperasi una debole soluzione di ammoniaca.

Per neutralizzare lo iodio adoperasi una debole soluzione di tiosolfato sodico.

Nella soluzione neutralizzante gli oggetti devono rimanere su per giù 10'; poi ancora si passano e si lasciano in nuova acqua distillata per altri 10'; dopo di che si fanno le colture.

Queste per altro sono regole troppo schematiche. Così Ottolenghi sperimentando col sublimato ha visto che si hanno risultati più attendibili mescolando la sospensione microbica direttamente con la soluzione della sostanza chimica, in rapporti determinati; passato il tempo stabilito, si versano quantità misurate della miscela in matracci contenenti 10 cmc. di brodo, indi si fa l'aggiunta del liquido neutralizzante (H_2S) in eccesso; passati 15' si aggiungono 10 cmc. di siero bovino sterilizzato discontinuamente; ed infine i matracci si pongono in termostato. Il siero bovino ha lo scopo di attenuare l'azione tossica del liquido neutralizzante, la cui aggiunta in eccesso è a sua volta necessaria per sottrarre ai corpi batterici possibilmente ogni traccia del disinfettante.

D. — DIMOSTRAZIONE DELLE PROPRIETÀ BIOFISICHE E BIOCHIMICHE

Per la natura di questo libro, ci restringiamo solo a ricordare brevemente i mezzi che servono alla dimostrazione qualitativa dei fenomeni biochimici dei batteri e delle principali sostanze cui essi dànno origine col loro metabolismo.

Produzione di calore.

Per dimostrare la produzione di calore delle colture batteriche durante l loro sviluppo, si adoperano dei calorimetri : per la natura speciale delle ricerche, il Rubner ne ha ideato uno di costruzione differente nei particolari dai calorimetri usati generalmente in fisica. Si può con esso determinare il calore usufruito dai batteri per il ricambio materiale, ed il lieve aumento di temperatura che la loro massa presenta durante l'accrescimento.

Produzione di luce.

Vi è un gruppo di batteri, di specie diverse, che sono fosforescenti e diconsi perciò *fotobatteri.* La fosforescenza delle colture si osserva stando in una camera buia. Perchè si manifesti, occorre coltivare i fotobatteri in adatti sostrati nutritivi molto salati, dei quali riportiamo solo quello di Beijerink, modificato da Zettnow.

100 gr. di carne ben pulita di merluzzo o di aringa si triturano e si cuociono con 150 gr. d'acqua, in bagnomaria a 60°, per 2-3 ore; si passa per un panno e si spreme.

Il liquido si acidifica fortemente con soluzione normale di acido cloridrico, poi si fa bollire per 10' e si filtra. Al filtrato si aggiunge 0.1 % di $MgSO_4$, 3 % di *NaCl*, 1 % di peptone, 0.25-0.50 % di glicerina, e tanta liscivia sodica finchè la reazione diventi leggermente alcalina.

Si sterilizza nella pentola di Koch per 15', si filtra, si distribuisce in provette e si sterilizza a vapore fluente.

Questo liquido nutritivo può essere solidificato con l'aggiunta del 10 % di gelatina o del 2 % di agar.

Fluorescenza.

Vi sono dei batteri che producono questo fenomeno e si chiamano tutti insieme *fluorescenti*, benchè appartengano a specie diverse. La fluorescenza dei batteri non ha bisogno di espedienti speciali per essere dimostrata. Nelle colture in brodo o in agar o in gelatina si riconosce facilmente. Si può estrarre con acqua distillata la sostanza fluorescente dei batteri, che dicesi batteriofluoresceina, e della cui composizione chimica nulla si conosce. Il fenomeno è più evidente e intenso, quando in una camera oscura un sottile fascio di luce elettrica ad arco si fa battere sulla coltura.

Pigmenti.

Sono di svariatissimo colore, e chimicamente poco noti. Poche cose diciamo intorno all'estrazione ed alle condizioni che favoriscono la produzione di alcuni di essi.

La piocianina, di bel colore verdazzurro, si estrae facilmente col cloroformio od anche con l'etere o col benzolo.

Il pigmento giallo di alcune specie, per es. dello stafilococco aureo, prende un color turchino indaco, che passa poi lentamente al violetto, sotto l'azione dell'acido solforico concentrato.

La sincianina, pigmento di colore ceruleo cupo del bacillo del latte azzurrigno, per l'azione degli alcali fissi diventa rosa, e col tempo si fa bruna.

La prodigiosina, bel pigmento cremisino del bacillo prodigioso, è solubile in acqua, e si scolora, cioè si trasforma in una leucobase per l'azione riducente dell'idrogeno *in statu nascendi*, laddove un'altra specie di pigmento rosso, che producono altri batteri, nella stessa condizione resta inalterato.

Alla produzione dei pigmenti contribuisce la temperatura a cui si fanno sviluppare le colture. Quasi necessaria è la presenza di magnesio e solfo. L'esclusione della luce è sfavorevole; così pure l'acidità leggiera del terreno, l'aggiunta di glicerina o zucchero.

Proprietà ossidanti.

Si possono dimostrare in parecchie specie batteriche, col metodo di Schultze.

Si prepara una soluzione alcalina di α-naftolo, sciogliendone un grammo in 100 cmc. di acqua bollente, mediante l'aggiunta di liscivia sodica a gocce; raffreddata la soluzione, il naftolo in parte precipita, ma vien ridisciolto del tutto con la cauta aggiunta di altre gocce di liscivia. Si mescola questa soluzione con una soluzione acquosa 1 ‰ di dimetil-p-fenilendiamina, e si filtra più volte. Il filtrato chiaro si aggiunge a dell'agar nutritivo fluidificato. nella proporzione di un volume a tre. In quest'agar, che si versa dentro scatole di Petri, ed ha un pallido colore azzurrino, si seminano i germi. Se questi hanno proprietà ossidanti, il terreno diviene turchino intenso.

Proprietà catalitica.

Molti batteri scompongono l'acqua ossigenata in acqua ed ossigeno libero.

Per dimostrare queste proprietà si aggiungono a 10 cmc. di una brodocoltura di 24-48 ore due gocce di H_2O_2, più propriamente di peridrolo Merk (acqua ossigenata al 30 %): se il germe sviluppato ha potere catalitico, si formano via via delle bollicine, che si raccolgono in una schiuma alla superficie del liquido.

Si può anche fare una determinazione quantitativa di tale potere.

In tal caso, secondo le indicazioni di Zirolia, si allunga un cmc. di coltura con 89 cmc. di acqua distillata sterile, e si aggiungono 10 cmc. di una soluzione 1 % di H_2O_2. La miscela si versa rapidamente in una bottiglia di vetro opaco a tappo smerigliato, e si mette alla temperatura voluta, p. es. 18°, 25° ecc. Dopo periodi determinati di tempo, si prelevano 10 cmc. del liquido, si allungano in un matraccio Erlenmeyer con 30-50 cmc. di acqua distillata, vi si aggiungono 5-10 cmc. di acido solforico al 20 %, e si titola la quantità di H_2O_2 indecomposta per mezzo di una soluzione di $KMnO_4$ $\frac{N}{10}$ o $\frac{N}{50}$, secondo i casi.

Per differenza si conosce la quantità di H_2O_2 trasformata.

Proprietà riducenti.

Per dimostrare le proprietà riducenti dei batteri, si aggiungono ai terreni di coltura sostanze svariatissime, le quali, venendo ridotte, cambiano

colore e dànno precipitati o speciali prodotti solubili o volatili. Si adoperano il turchino di metilene, la fucsina, il rosso neutro ed altri colori d'anilina, il carminio e l'azzurro d'indaco, vari sali metallici, ecc. Avendo l'uso di alcune di queste sostanze valore pratico per la diagnosi di specie o per altri scopi, se ne parlerà a suo luogo nella parte descrittiva.

La riduzione di alcuni sali, specialmente dei telluriti e seleniti, è operata da gran numero di germi: questi sali vengono trasformati in tellurio o selenio elementari, che si riconoscono al colore grigio o giallo che assumono i liquidi in cui si compie la riduzione. Gosio, che stabilì la natura generale del fenomeno, vide che esso è utilizzabile in pratica per rivelare eventuali inquinamenti nei sieri terapeutici: usando il tellurito di potassio, questo può essere ridotto con effetti evidenti, anche quando si trova nella concentrazione di 1 : 100000-1 : 200000. In tale concentrazione il sale non ha azione tossica.

Per dimostrare la riduzione dei sali arsenicali, si procede, secondo Gosio, così: In un cuneo di patata si fa un piccolo incavo per mettervi un po' di arsenito potassico commisto ad una pallottola di pasta. Si sterilizza, poi si fa la semina, e si chiude la provetta con cappuccio di gomma bene stretto al collo, oppure con tappo di gomma sovrapposto al tappo di ovatta. La coltura si mette in termostato a 22° o meglio a 37°. Quando la coltura è sviluppata, se si apre, si sente un caratteristico odore di aglio.

Sebbene questa reazione sia propria di alcuni ifomiceti, non dei batteri, pure se ne parla qui a cagione della sua importanza pratica, sia dal lato igienico, sia dal lato medico-legale, e se ne riparlerà a proposito delle muffe.

Produzione di sostanze volatili e gas.

Aprendo delle colture di parecchie specie batteriche, specialmente delle anaerobiche, si sentono odori svariatissimi, per lo più sgradevoli, spesso ripugnanti: è questa una prova dei gas e delle sostanze volatili che producono i batteri. Per lo studio di essi bisogna ricorrere a colture in gran volume di sostrato, e ad apparecchi speciali.

Qui diremo soltanto come si può riconoscere la loro presenza, allorchè se ne sviluppa una certa quantità.

L'idrogeno solforato si dimostra fissando fra il il tappo e la provetta una strisciolina di carta bibula imbevuta di nitrato di piombo: la provetta si copre con un cappuccio di gomma bene stretto. L'imbrunimento fino all'annerimento della strisciolina prova lo sviluppo di questo gas dalla coltura.

L'ammoniaca si dimostra nelle colture già sviluppate e tenute chiuse, durante lo sviluppo, con cappuccio di gomma sopra il tappo d'ovatta. Aprendole e introducendovi una bacchettina bagnata di acido cloridrico puro, se v'è ammoniaca, si vede formarsi una nubecola di cloruro d'ammonio intorno alla bacchettina.

Per dimostrare la presenza di anidride carbonica, si devono fare le colture in tubi da fermentazione, che sono tubi ad U, con un braccio lungo chiuso ed uno breve aperto (v. fig. 467): ve n'è di varie forme e grandezze. Se i batteri producono anidride carbonica, questa si raccoglierà in alto sotto la cupola del braccio lungo, insieme con altre sostanze gassose. Tolta la col-

tura dal termostato, si nota il livello del liquido nel tubo lungo; poi si aggiunge alla coltura una soluzione di potassa: se il livello del liquido sale, vuol dire che nello spazio soprastante c'era dell'anidride carbonica, la quale è stata assorbita dalla potassa.

Per raccogliere un miscuglio di gas prodotti dai batteri ed analizzarli, si usano apparecchi preparati sul tipo dei palloni Pasteur. Un grande pallone pieno di liquido nutritivo si semina con la specie batterica che si vuole studiare, poi si chiude con un tappo di gomma biforato. Per un foro passa e pesca fino al fondo il tubo di un imbuto separatore, che contiene del liquido nutritivo fino a un certo livello sopra la chiavetta; nell'altro è introdotto un tubo a gomito, il cui braccio orizzontale è munito di chiavetta. I gas che si sviluppano, raccogliendosi sotto il tappo, fanno pressione sul liquido nel pallone, che quindi si abbassa, inalzando di altrettanto il livello del liquido nell'imbuto separatore.


Fig. 467. — Tubo da fermentazione.

I gas che si sono svolti si fanno passare, aprendo la chiavetta del braccio orizzontale del tubo corto, negli apparecchi di raccolta per l'analisi.

Produzione di alcali ed acidi solubili.

Ai terreni liquidi o solidi si aggiungono poche gocce di una soluzione di laccamuffa. L'arrossamento del terreno o il suo trascoloramento in turchino indicano rispettivamente la produzione di acidi o di alcali. S'intende che, con metodi chimici, può anche titolarsi precisamente l'acidità o l'alcalinità delle colture, purchè si tenga conto della reazione del terreno prima della semina, o purchè il terreno sia stato preparato con reazione neutra.

Gli acidi vengono prodotti principalmente dalla scissione degli idrati di carbonio, massime degli zuccheri, che molti batteri attaccano. Perciò queste sostanze si aggiungono ai terreni di coltura. Ma quando si devono fare delle ricerche per vedere se un dato germe attacchi una qualche sorta di idrato di carbonio, bisogna usare i sostrati nutritivi privi d'ogni traccia di siffatte sostanze; e l'infuso di carne, dal quale si preparano i terreni, sempre ne contiene. Per liberarnelo, prima di trasformarlo in brodo o gelatina o agar, si semina copiosamente col *Bact. coli*, e si lascia stare in termostato per 14-16 ore; dopo di che, essendo il glicogeno tutto scomposto, la coltura ottenuta si sterilizza, riscaldandola un'ora a 60° C., oppure, se si vuole, filtrandola per candela di porcellana: il liquido sterilizzato si adopera per la preparazione dei vari sostrati.

Produzione di speciali sostanze aromatiche ed alifatiche.

Reazione del fenolo. — Alla coltura sviluppata in brodo privo di zucchero si aggiunge il quinto del suo volume di HCl, e si distilla. Il fenolo si può dimostrare in due modi nel distillato.

1. Facendo agire l'acqua di bromo, si ottiene un precipitato fioccoso.
2. Neutralizzando cautamente con carbonato di calcio, ed aggiungendo una soluzione allungatissima di percloruro di ferro, si ottiene una colorazione violetta.

Reazione dell'indolo. — Si dimostra nelle colture in brodo privo di zucchero od in acqua peptonata (che si suppone abbiano il volume di circa 5 cmc.) aggiungendovi circa dieci gocce di una soluzione di nitrito potassico al 0.2 % ed altrettante di una soluzione di acido solforico al 25 % (metodo Salkowski). Per alcuni germi è superflua l'aggiunta del nitrito, poichè si trova già nella coltura, avendolo i germi stessi formato dal nitrato potassico che i terreni di coltura sempre contengono in piccola quantità. La presenza dell'indolo si rivela alla colorazione del liquido che va dal rosa al rosso ciliegia. La sostanza che dà il colore si può estrarre con alcool amilico.

Più sensibile della originaria reazione di Salkowski è quella di Nencki.

Si acidifica la brodocoltura con poche gocce di acido acetico, poi si aggiungono 2-3 cmc. di alcool-etere, si agita e si lascia stare finchè l'etere si è separato.

Allora l'etere si decanta, e si fa evaporare in una capsula di porcellana.

Al residuo si aggiungono I-II gocce di soluzione di nitrito potassico al 0.02 %, e IV-VI gocce di acido solforico puro. La presenza dell'indolo si rivela per la comparsa della colorazione rosea.

Anche può dimostrarsi l'indolo con la reazione di Weyl-Legal. Nella coltura si lasciano cadere V-X gocce di una soluzione di nitroprussiato sodico al 5 %, ed alcune gocce di una soluzione di soda al 30 % : dopo qualche istante si aggiungono X-XV gocce di acido acetico. In presenza d'indolo compare più o meno presto una colorazione turchina.

Finalmente, secondo Crisafulli, l'indolo si può riconoscere acidificando con poche gocce di HCl la coltura ed immergendovi una scheggetta di legno di pino, la quale si colora in rosso.

Reazione del triptofane o proteinocromica. — Si dimostra acidificando le brodocolture con acido acetico, e poi aggiungendovi a goccia a goccia acqua di bromo o di cloro. Essendovi del triptofane, si vede il liquido colorarsi in violaceo.

Reazione di Voges e Proskauer. — Alcuni batteri producono dell'acetilmetilcarbinolo. Questo si dimostra nelle colture in brodo glicosato, aggiungendovi poche gocce di liscivia potassica; le colture si lasciano stare a temperatura di stanza ed alla luce diffusa. Dopo uno o più giorni il liquido prende una colorazione rosea simile a quella di una soluzione di eosina.

Dimostrazione di alcaloidi.

Dalle colture si estraggono col metodo di Stas-Otto, che si fonda su questo principio: aggiungendo un acido, p. es. acido tartarico, ad un liquido contenente degli alcaloidi, se ne formano dei sali acidi, che sono, come i neutri, insolubili in etere; rendendo poi alcalina la soluzione, gli alcaloidi vengono liberati, e possono essere estratti in imbuti separatori con etere, alcool amilico, benzolo. Queste soluzioni si evaporano, ed il residuo si saggia coi reattivi generali degli alcaloidi, quali sono le soluzioni di cloruro di platino o di bicloruro di mercurio, l'acido picrico, il tannico, la soluzione iodo-iodurata, il reattivo di Nessler, quello di Dragendorff, ecc.

Si possono gli alcaloidi delle colture batteriche ottenere in forma cristallina dalle soluzioni eteree, benzoliche, amiliche.

Dimostrazione di proprietà enzimatiche.

Già parecchie delle trasformazioni fin qui ricordate risultano certamente da azioni enzimatiche. Ora alcune modificazioni dei terreni di coltura, le quali si osservano a vista, sono pure, o possono essere, prodotte da azioni enzimatiche.

La fluidificazione della gelatina, la dissoluzione della fibrina, del siero e dell'albume d'uovo solidificati, la coagulazione del latte e la fluidificazione del coagulo formato, possono essere l'espressione dell'attività enzimatica dei batteri che sono stati seminati nei detti terreni nutritivi.

Per ciò che concerne la coagulazione del latte, bisogna tener presente che questo può rapprendersi anche per la semplice reazione acida: quindi prima di affermare che il fenomeno è prodotto da un enzima, bisogna escludere questa causa d'equivoco, saggiando la reazione del sostrato, ed eventualmente cercando di dare la prova diretta della presenza dell'enzima nel corpo batterico o nel liquido ambiente.

Dalle colture di certi germi alcuni enzimi si possono artificialmente separare, con gli stessi metodi che fra breve saranno descritti per la preparazione dei veleni: essi producono per sè soli, indipendentemente dai batteri vivi donde provengono, i medesimi effetti specifici sulle varie sostanze e sui terreni di coltura.

Uno studio sistematico dell'azione degli enzimi proteolitici e dell'andamento del fenomeno si può fare adoperando la gelatina, la fibrina, la caseina solidificata, secondo le ampie indicazioni date dal Fermi.

Non essendo qui il caso di riferire tutti i particolari, credo più opportuno dare un'idea del come tale genere di ricerche si può eseguire; e scelgo ad esempio uno dei metodi dell'autore nominato, e precisamente quello concernente la fluidificazione della gelatina.

Si sciolgono a caldo 3 gr. di gelatina marca d'oro in 100 cmc. di una soluzione acquosa di timolo 1 ‰ o di acido fenico 5 ‰. La soluzione di gelatina si può neutralizzare, o alcalinizzare, o darle diverso grado di acidità, adoperando della soda all'1-2 ‰ o degli acidi minerali all'1-5 ‰ o degli acidi organici al 5-10 ‰. Si versa la soluzione in tanti tubetti del diametro di 7 mm. circa, nella quantità di 1 cmc. per ciascuno. S'incolla su ogni tubetto una strisciolina di carta, che vada dalla superficie libera della gelatina già solidificata fino al fondo: essa serve per segnare, giorno per giorno, con tratti orizzontali, la superficie di separazione fra la soluzione fluidificata per opera dell'enzima e quella rimasta ancora solida. Il liquido contenente l'enzima deve contenere 1 ‰ di timolo o 5 ‰ di acido fenico: se ne versa ½-1 cmc. in un tubetto, e questo si tiene a temperatura costante di 20-22°, prolungando l'osservazione per molti giorni

Gli enzimi diastatici, che trasformano l'amido o la destrina in zucchero si dimostrano, secondo Fermi, nel seguente modo: Si mescolano le colture, cui si è aggiunto 1-2 % di timolo, con pappa d'amido contenente pure 1 % di timolo, ed il miscuglio si tiene 6-8 ore in termostato. Dopo si fa la reazione del Fehling, la quale, riuscendo positiva, prova che l'amido è stato scomposto con produzione di maltosio.

L'invertasi dimostrasi mescolando le colture, contenenti 1 % di timolo, con soluzioni di saccarosio 1-2 %, contenenti anch'esse 1 % di timolo. Si

tiene la miscela alcune ore in termostato, indi si eseguisce la reazione di Fehling.

Gli enzimi lipolitici o lipasi, si trovano assai di rado nei batteri · si riconoscono aggiungendo ai terreni di coltura la monobutirrina, e ricercando la crescente acidità proveniente dalla scomposizione di questo grasso.

Dimostrazione del potere emolitico.

Non poche specie batteriche sono capaci di sciogliere il sangue mescolato ai sostrati di coltura, siano liquidi o solidi, p. es. brodo o agar con sangue.

Tale proprietà può non dipendere da un potere emolitico vero e proprio dei batteri: se infatti fra i prodotti cui dà origine l'attività biochimica loro vi è dell'ammoniaca, il dissolvimento del sangue è da attribuirsi a questa, in tutto o in parte.

Occorre quindi, prima di asserire il potere emolitico di un germe, escludere questa causa d'errore.

Una volta eliminata questa causa d'errore, occorre vedere se il potere emolitico sia funzione diretta della vita dei germi, oppure sia dovuto alla produzione di emolisine.

A tal uopo, si fanno delle colture in sostrati liquidi, e si filtrano per candele di porcellana. Nel filtrato, che dev'essere neutro, o, se neutro non è, neutralizzato, si ricerca l'emolisina nel seguente modo. Si approntano del filtrato le diluzioni:

1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100 . . . . .

e di ciascuna si versa un cmc. in altrettante provettine, in ognuna delle quali si aggiunge un cmc. di sospensione al 2.5 % di poltiglia corpuscolare di sangue fresco in soluzione fisiologica. In un'ultima provetta, per controllo, si allunga un cmc. di sospensione con un cmc. di soluzione fisiologica. Si agitano tutte le provette e si tengono 4 ore a 37°.

Ritirate dal termostato, si lasciano 18 ore in ghiacciaia, poi si osservano i risultati. Se il filtrato contiene emolisina, le emazie saranno disciolte, ed il liquido di color rosso rubino, almeno in qualcuno dei primi tubi; se esso è molto ricco di emolisina, lo stesso fatto si osserverà anche negli ultimi tubi. Naturalmente l'emolisi avviene in vario grado nelle diverse miscele: in alcune si può vedere il fenomeno incompleto, cioè il liquido laccato più o meno leggermente, mentre al fondo si raccoglie la parte delle emazie indisciolte.

Dimostrazione del potere leucocida.

Parecchi germi hanno potere leucocida ossia leucolitico; per vedere se esso dipenda dalla produzione di leucocidine, si filtrano delle colture in sostrati liquidi, come è stato detto per le emolisine. La dimostrazione del potere leucocida del filtrato si fa col metodo di Neisser e Wechsberg.

Si fonda sul seguente principio : i leucociti, mentre son vivi, sospesi in una soluzione di turchino di metilene, riducono questo colore in leucobase, quindi scolorano il liquido; quando son morti, la riduzione manca, quindi il liquido resta colorato.

Se i leucociti si sospendono in un liquido contenente leucocidine e turchino di metilene, in primo tempo questo sarà ridotto in leucobase, ma poi, via via che i leucociti muoiono, ritorna com'era prima, ricolorando il liquido.

L'esperienza si fa in questo modo,

Si versa un cmc. di sospensione di leucociti vivi in ciascuna di due provettine; nella prima si aggiunge un cmc. del liquido presunto leucolitico, nella seconda un cmc. di soluzione fisiologica.

In tutt'e due si fanno poi cadere due gocce di una soluzione di turchino di metilene (turchino di metilene gr. 1, alcool assoluto 20, acqua distillata 29) diluita con soluzione fisiologica nel rapporto 1 : 50.

Ciò fatto, si versa uno strato di olio di vaselina sterile sopra ciascuna delle due miscele. Lo strato di olio serve per escludere l'azione dell'ossigeno atmosferico, che potrebbe riossidare la leucobase via via che si produce, e mascherare il fenomeno.

Si pongono le due provette a 37°, e dopo 2-4 ore si ritirano. Se il liquido in esame è leucocida, si vedrà che, mentre nel tubo di controllo la porzione inferiore del liquido è incolora, nell'altro invece tutta la colonna liquida è uniformemente colorata.

E. — PREPARAZIONE DI VELENI BATTERICI.

Si possono ottenere, secondo i casi, dalle colture in sostrati liquidi, sottoposti a filtrazione, oppure dai corpi batterici, prima lavati, e poi trattati con vari metodi.

Al primo metodo si ricorre per lo più nel caso di germi produttori di esotossine; al secondo metodo nel caso di germi che possiedono endotossine.

I. — PREPARAZIONE DI TOSSINE SOLUBILI.

Si adoperano a ciò colture in brodo comune o in brodi o altri liquidi nutritivi speciali, in cui siano vegetati abbondantemente i batteri le cui tossine si vogliono ottenere. Basterebbe filtrare colture di 2-3 giorni di vita, per ottenere filtrati assai tossici; però si sogliono filtrare dopo 1-3 settimane, secondo i casi, perchè si è visto che dopo questo periodo la tossicità delle colture è maggiore.

Una parte importante fra le operazioni che si fanno per ottenere le tossine solubili, è rappresentata dalla

Tecnica della filtrazione.

Diremo separatamente della scelta dei filtri, della loro montatura e sterilizzazione, dei mezzi di promuovere la filtrazione e delle precauzioni principali da usare.

Scelta dei filtri.

I filtri comunemente adoperati son fatti di porcellana (filtri Chamberland, Kitasato, Silberschmidt, Pukall, ecc.), oppure sono ricavati da una roccia biogena, composta di scheletri d'infusorî (filtri Berkefeld-Nordtmeyer): si possono fare anche filtri d'asbesto. Quasi tutti sono cilindrici, onde si chiamano anche candele; i filtri Pukall hanno forma di palloncino. Sono tutti cavi, con un capo aperto e l'altro a fondo cieco.

Il capo aperto può essere semplice (candele Kitasato); ovvero terminare con un orlo piano e spesso, sporgente infuori dal corpo cilindrico del filtro (candele Silberschmidt, Maassen); oppure essere conformato a capezzolo, cioè l'orlo sporgente continuarsi restringendosi in una specie d'appendice, che ben si assomiglia ad un padiglione di tromba avente l'orlo unito al contorno della candela (candele Chamberland, candele Berkefeld tipo Chamberland): così l'orlo sporgente della prima specie di filtri, come l'orlo e il capezzolo dei secondi sono verniciati.

Può anche il capo aperto essere masticato ad un attacco metallico, composto di una ghiera di presa e di un lungo tubo che fa corpo con essa, e che nel tratto prossimo alla ghiera è solcato a vite, per modo che sopra vi possa girare un disco metallico forato nel centro a madrevite (candele Berkefeld): vedremo lo scopo e l'uso di siffatto congegno.

Le dimensioni dei filtri variano secondo il bisogno. Spesso, avendosi poco materiale da filtrare, è necessario servirsi di candele assai piccole. I filtri Chamberland ed i filtri Berkefeld tipo Chamberland sono lunghi circa una spanna, con un diametro esterno di circa 3 cm.; i filtri Silberschmidt ed i comuni Berkefeld con attacco metallico sono lunghi quanto un dito ed anche meno, e larghi press'a poco 1.5-2 cm.; vi sono poi filtri Berkefeld piccolissimi, lunghi appena 2 cm., che hanno ricevuto il nome di candele lillipuziane, ed anche filtri Silberschmidt della stessa grandezza. Le semplici e lunghe candele Kitasato sono le più sottili di tutte, avendo un diametro esterno di circa 1 cm.; i filtri Maassen sono mezzanamente lunghi, ma differiscono da tutti gli altri per essere molto larghi, con un diametro esterno di circa 6 cm. ed una corrispondente capacità maggiore.

Montatura e sterilizzazione dei filtri; mezzi da promuovere la filtrazione.

Ogni filtro, per essere messo in opera, va congiunto ad un recipiente destinato a ricevere il liquido da filtrare, e ad un altro che deve raccogliere il liquido filtrato. Per far passare il liquido con una certa rapidità attraverso i pori del filtro, bisogna produrre una differenza di pressione atmosferica fra i due recipienti, il che si può ottenere in due modi. O si comprime fortemente il liquido da filtrare, ed allora bisogna che il recipiente che lo contiene sia ermeticamente chiuso, e tale da sopportare la pressione di 2-4-6 atmosfere; ovvero si aspira l'aria racchiusa nel recipiente destinato a raccogliere il filtrato, ed in tal caso è questo il recipiente che deve essere ermeticamente chiuso, e robusto tanto da resistere alla pressione di una atmosfera. Nel primo caso la forza che promuove la filtrazione può essere spinta fino a 3-4 atmosfere; nel secondo caso è ovvio che, non essendo pra-

ticamente possibile il vuoto assoluto, la forza che sollecita la filtrazione (differenza fra la pressione atmosferica che preme sul liquido da filtrare e la pressione residua nel recipiente che si viene evacuando), resta sempre inferiore, sia pur di pochissimo, ad un'atmosfera.

Quando si ha molto liquido da filtrare (40-400 cmc.), si adoperano per lo più apparecchi prementi a 2-4 atmosfere allo scopo di compiere l'operazione in breve tempo; i quali apparecchi riescono anche vantaggiosi allorchè il materiale da filtrare passerebbe troppo lentamente con la semplice evacuazione del vaso che deve raccogliere il filtrato.

Per filtrare sotto pressione serve l' apparecchio Chamberland, connesso con una ordinaria pompa da fare il vuoto. È costituito di un recipiente cilindrico di metallo, che può chiudersi in alto ermeticamente con un disco metallico, ed in basso continuasi con un tubo fornito nel suo mezzo di una chiavetta, e fatto a vite nella porzione terminale. Il coperchio ha tre fori, dei quali uno serve per la connessione alla pompa mediante un tubo metallico pieghevole, l'altro porta un imbutino, munito di una chiavetta nel collo, il terzo mette in comunicazione l'interno con un manometro.

Il passo di vite, col quale termina il tubo che scende dal fondo del corpo dell'apparecchio, serve per avvitarvi un robusto cilindro metallico, destinato a ricevere la candela. Questa s'introduce col fondo cieco verso la parte avvitabile del cilindro metallico; sul contorno dell'estremità opposta di questo viene quindi a poggiare l'orlo sporgente della candela, interpostovi naturalmente un cercine di caucciù e di amianto, per ottenere una buona aderenza. Una ghiera metallica, forata nel mezzo per dar passaggio al capezzolo, si avvita al contorno inferiore del cilindro, forzando tanto da assicurare una chiusura ermetica.

Per filtrare mediante l'aspirazione dell'aria dai recipienti che devono raccogliere il filtrato, questi sono muniti, qualunque sia la loro forma, di una tubatura laterale, impiantata ad angolo retto sul collo, in prossimità della bocca: la tubatura serve a dare attacco ad un robusto tubo di gomma, destinato a mettere in comunicazione il vaso evacuando con una pompa a caduta d'acqua. I recipienti che si adoprano sono di vetro robusto, ed hanno forma di tubi come quelli introdotti da Silberschmidt insieme con le rispettive candele, o più comunemente di bottiglie coniche, le quali diconsi di Kitasato: gli uni e le altre hanno intorno all'apertura un labbro piano, talora smerigliato, sporgente in fuori.

Per le candele Maassen si usano vasi speciali, con la parte inferiore conica e la superiore cilindrica; essi, oltre alla tubulatura laterale al collo, sono anche provvisti di un'altra tubulatura, che obliquamente si parte dalla parete conica, in prossimità del fondo, facendo col piano di questo un angolo di circa mezzo retto (v. fig. 468).

I filtri Silberschmidt e Maassen si montano adattando sotto il loro orlo sporgente un cercine di caucciù o di amianto, introducendoli poi nei rispettivi recipienti, in modo che il cercine poggi bene sul labbro di essi; per ottenere un buon combaciamento si applica un cappuccio di gomma forato nel centro, in modo che l'orlo elastico di esso venga a stringersi sotto il labbro del recipiente e il foro corrisponda all'apertura dei filtri. Oppure il combaciamento può ottenersi mediante un congegno fornito di viti a pressione, per mezzo delle quali si stringe l'orlo della candela contro quello del vaso (fig. 468).

Una candela Kitasato si monta adattando al suo capo aperto un imbutino di vetro, mediante un pezzo di tubo di gomma, ed introducendolo, fino alla congiunzione con l'imbuto, nel foro di un tappo di gomma col quale si chiude una bottiglia da filtrazione: la candela quindi scende fino al fondo nel vaso da evacuare.

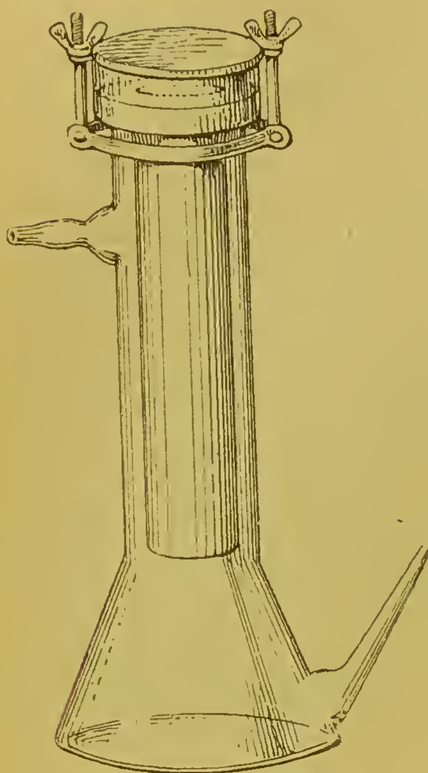


Fig. 468. — Filtro Reichel-Maassen.

Le candele Chamberland possono anche essere adoperate per filtrare sotto aspirazione, montandole come si vede nella fig. 469. La candela pesca in un cilindro di vetro C, ed il suo capezzolo è congiunto con un tubo di vetro *a* per mezzo di un tubo di gomma. Il cilindro ha una tubulatura A terminante superiormente ad imbuto, per il quale si versa il liquido da filtrare. Il tubo *a* è connesso con la pompa.

Per montare le candele Berkefeld con attacco metallico, si usano vasi cilindrici di vetro con fondo piano e forato nel mezzo. Dal tubo metallico della candela si svita il disco, di cui si è parlato a pag. 1296, e la candela si introduce nel cilindro di vetro in maniera che il tubo metallico passi per il foro del fondo, e su questo si adagi la ghiera di presa: allora si passa un anello di caucciù intorno al tubo, fino a poggiarlo sul fondo del cilindro di vetro; in ultimo si riavvita il disco metallico, comprimendolo contro l'anello di caucciù, per ottenere un'adesione perfetta. La lunga porzione del tubo metallico che rimane libera si introduce nel foro di un tappo di gomma, col quale si chiude la bottiglia di filtrazione (fig. 470).

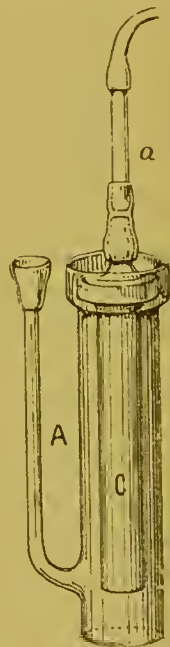


Fig. 469. — Candela Chamberland approntata per filtrare sotto aspirazione.

Per estrarre l'aria dal recipiente evacuando degli apparecchi descritti, si adoperano delle pompe a caduta d'acqua, delle quali si hanno parecchi modelli. Alcune pompe sono fatte di vetro, e tra esse la più semplice è quella di Fischer. È composta di un cilindro che d'ambo i capi si restringe in un tubo. Il tubo superiore fa tutt'uno con un tubo che vien giù nell'interno del cilindro, assottigliandosi sempre più e terminando con un forellino dentro la bocca di un piccolo imbuto emisferico posto al di sopra del restringimento del cilindro; il collo dell'imbutino alla sua volta scende ancora per arrestarsi, con apertura libera, poco più su che cominci il tubo inferiore del cilindro medesimo. Questo porta, presso al suo restringimento superiore, una tubulatura laterale impiantata ad angolo retto, alla quale si attacca il tubo di gomma che mette la pompa in comunicazione col recipiente da vuotare.

La pompa funziona così: l'acqua, che deve avere la pressione di più di

un'atmosfera, scende nel tubo superiore ed esce con violenza dal foro terminale, battendo contro il fondo dell'imbutino e spargendosi in guisa da produrre dei vortici, i quali trascinano seco l'aria giù per il collo dell'imbuto, e poi per il tubo inferiore del cilindro, che è il tubo d'efflusso. Così l'aria si viene rarefacendo nel cilindro, e per conseguenza anche nel recipiente evacuando che comunica con esso. Alla pompa va connesso un manometro a mercurio, che si innesta nel tratto di tubatura che congiunge pompa ed apparecchio di filtrazione: così pure bisogna interporre lungo questo tratto una valvola od un recipiente, o tutt'e due insieme, che impediscano la eventuale entrata dell'acqua nel vaso da evacuare, il quale inconveniente può intervenire per un improvviso sbalzo di pressione nella conduttura. Si costruiscono ora anche pompe metalliche di questo tipo.

Là dove non si abbia dell'acqua sotto pressione, si può adoperare un tipo di pompa alquanto diverso, purchè però il tubo di efflusso possa continuarsi per diritto con un tubo di scarico lungo almeno 10 metri.

Questo tipo di pompa differisce da quello descritto per non aver l'imbutino, e perchè il tubo superiore scende internamente fin presso al restringimento inferiore, terminando con un'apertura quasi eguale alla sua sezione. L'acqua anche in questa pompa si fa entrare per il tubo superiore, mentre l'apparecchio di filtrazione è congiunto alla tubulatura laterale del cilindro: l'acqua, entrando anche sotto una pressione di non molto inferiore ad un'atmosfera, si raccoglie a vortice verso il restringimento inferiore, producendo la rarefazione dell'aria. Però l'effetto che si ottiene col secondo tipo di pompa è inferiore a quello che può dare il primo tipo, col quale la pressione residua può scendere a circa 8 mm.

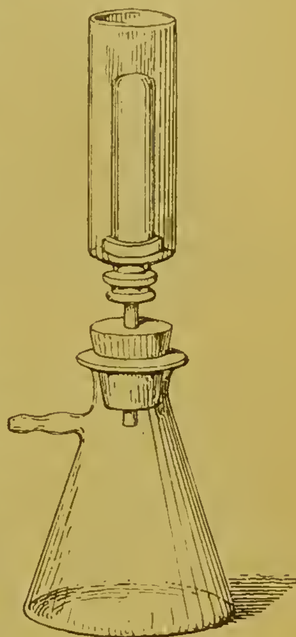


Fig. 470.
Filtro Berkefeld.

La sterilizzazione dei filtri, bell'e montati, si fa a vapore, sia nella pentola di Koch, sia nell'autoclave, avendo sempre cura che la temperatura cresca a poco a poco. Nel caso delle candele Chamberland, prima di sottoporle alla sterilizzazione, bisogna occludere con ovatta o carta bibula l'apertura del capezzolo e l'opposta apertura del cilindro metallico. Gli apparecchi sterilizzati si tolgono dalla pentola o dall'autoclave quando già sono raffreddati.

Il modo di servirsi delle candele Chamberland è semplice. Il cilindro metallico che contiene la candela si avvita sotto al corpo dell'apparecchio Chamberland; si versa il liquido nell'imbuto che si trova sul coperchio, in modo che questo scenda a riempire lo spazio compreso fra la candela e il suo cilindro, e poi riempia anche il corpo soprastante; chiusa la chiavetta dell'imbuto, si manovra la pompa, mentre il liquido che cola dal capezzolo si raccoglie in un matraccio sterilizzato.

Per mettere in opera i filtri Silberschmidt, Maassen o Kitasato, si congiunge la tubatura laterale dei rispettivi recipienti con la pompa a caduta d'acqua, e, servendosi di una pipetta, si versa il liquido nella cavità del filtro.

Prima di adoperare gli apparecchi Berkefeld, che anch'essi vanno congiunti con una pompa a caduta d'acqua, bisogna versare dell'agar fluidifi-

cato nel cilindro contenente il filtro, e versarne tanto che il suo livello sorpassi nettamente la linea di attacco della candela alla ghiera metallica, perchè la masticatura potrebbe non essere perfetta.

Le candele già adoperate devono essere sterilizzate subito dopo la filtrazione, sempre a vapore, in autoclave. Volendo servirsene ancora altre volte, prima di montarle e sterilizzarle di nuovo, conviene far passare per esse, ora dall'esterno all'interno, ora in senso opposto, dell'acqua in abbondanza, promovendo la filtrazione con la pompa.

Le candele usate più volte finiscono con l'avere i pori quasi ostruiti, sicchè per esse la filtrazione si compie assai lentamente. Bisogna allora rigenerarle. La rigenerazione può farsi ponendo sulla fiamma d'un fornello a gas la candela precedentemente essiccata, e portandola al calor rosso: in tal modo però possono conseguirne delle fenditure.

O meglio, si pone in autoclave a 2 atmosfere il filtro, sottoponendolo a parecchie decompressioni successive.

Oppure si fa una rigenerazione per via chimica, facendo passare attraverso alla candela successivamente una soluzione di permanganato potassico al 5 ‰ ed una soluzione di bisolfito sodico al 5 %.

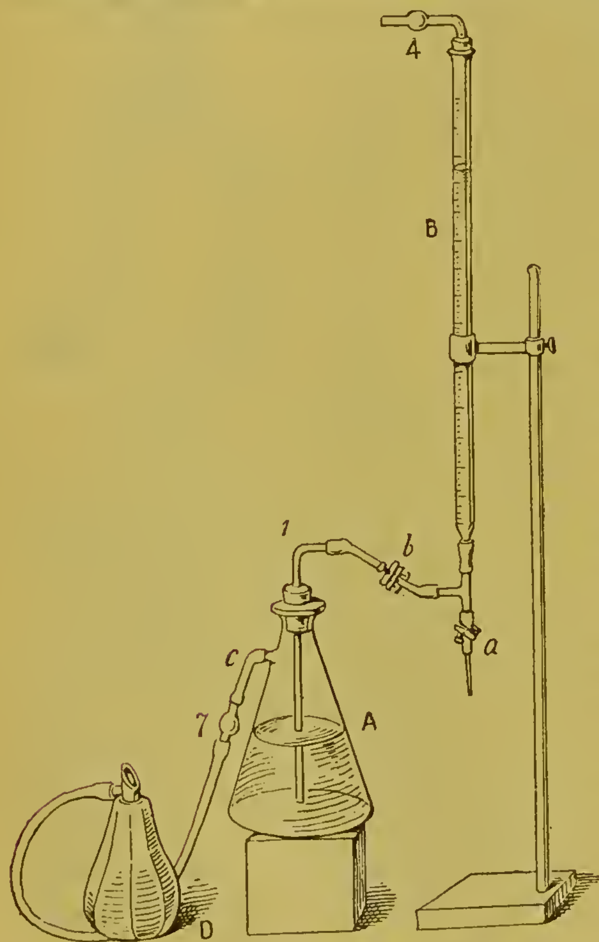


Fig. 471. — Distribuzione dei filtrati.

Precauzioni da usare durante e dopo la filtrazione.

La filtrazione deve essere possibilmente rapida. Compiuta la filtrazione, si stacchi cautamente il tubo di gomma dalla tubulatura laterale del vaso contenente il filtrato, affinchè l'aria vi rientri lentamente attraverso l'ovatta che riempie la bolla della tubulatura medesima. Il filtrato si travasa in adatti tubi o recipienti sterilizzati, che vanno conservati in refrigerante fino al momento di inocularli. Una parte del filtrato si mette da parte, dovendo servire all'osservazione microscopica ed alle colture per l'accertamento della sterilità.

Per evitare i travasi, quindi, ogni pericolo d'inquinamento dall'esterno, si può ricorrere all'apparecchio rappresentato dalla figura 471. La bottiglia A in cui trovasi raccolto il filtrato si libera dalla candela, e si chiude con un tappo di gomma, attraversato dal tubo di vetro 1; alla tubulatura laterale si attacca un tubo di gomma *c*, unito al tubo di una pera Centanni D, con interposizione di una bolla di vetro, 7, con-

tenente ovatta. Il tubo di vetro 1, per mezzo di un tubo di gomma, provvisto della pinza *b*, è connesso con un tubo a T, la cui branca trasversale si congiunge in alto con una buretta graduata B, e in basso, per mezzo di un tubo di gomma fornito della pinza *a*, con un sottile tubetto di vetro. La buretta è chiusa in alto da un tubo di vetro 4 con bolla contenente ovatta. I vari pezzi dell'apparecchio vanno separatamente sterilizzati prima della montatura.

L'apparecchio funziona così: stringendo la pera, mentre si tiene stretta la pinza *a* ed aperta la pinza *b*, il liquido sale nella buretta; inversamente, tenendo stretta la pinza *b* ed aperta la pinza *a*, il liquido cade dalla buretta e può essere distribuito in quantità misurate nei diversi recipienti.

II. — ESTRAZIONE DI VELENI DAI CORPI BATTERICI.

Si adoperano colture in terreni solidi; per lo più si raccoglie abbondante poltiglia batterica dalla superficie di colture fatte in agar in grandi scatole di Petri e sviluppate a 37° C. per 1-3 giorni.

In alcuni metodi si fa uso di un apparecchio per agitare le sospensioni batteriche: tale apparecchio dicesi scotitore. Lo scotitore è composto di un piatto di legno infisso in un asse, il quale porta più su un altro piatto scorrevole dall'alto al basso e viceversa e provvisto verso la periferia di alcuni fori. L'asse superiormente è infilato in un occhiello fissato ad un sostegno; in basso si impernia eccentricamente in uno dei raggi di una ruota orizzontale, sicchè esso viene ad essere leggermente inclinato. La ruota è mossa, per una trasmissione a cinghia, da un motore. I matracci nei quali trovasi il materiale da scuotere si pongono sopra il piatto di legno; si abbassa il disco soprastante in modo che i colli dei matracci restino ben fermi. Per poter fare tale pressione senza correre il rischio di rompere i matracci, i fori sono muniti di cerchi di gomma, che vengono quindi a stringere elasticamente i colli. I recipienti compiono, sottoposti all'azione di questo apparecchio, un movimento rotatorio e ondulatorio insieme.

1) Metodo di H. Buchner.

H. Buchner usò per ottenere i prodotti dei corpi batterici disfatti il metodo che E. Buchner aveva adoperato per i funghi inferiori, specialmente per alcuni blastomiceti, allo scopo di dimostrare l'endoenzima che attacca il glicosio.

La massa batterica si mescola intimamente con sabbia di quarzo e vi si aggiunge dell'acqua sterilizzata in maniera da formare una focaccia; la quale, stretta in una pezza di robustissima tela speciale, si sottopone alla pressione di 300-400 atmosfere nel torchio di Buchner. Il succo che ne cola si filtra per candele di porcellana.

I succhi batterici ottenuti con questo metodo sono stati chiamati *batterioplasmine*.

2) **Metodo di Macfadyen e Rowland.**

La massa batterica, tal quale si raccoglie dall'agar, si sottopone, in adatti apparecchi, alla temperatura dell'aria liquida, cioè a —180°-190° C. Poi si sospende in soluzione fisiologica, si centrifuga a lungo, e del liquido soprastante si sperimenta la proprietà tossica. Si può anche riprendere la massa triturata con soluzione di *KOH* ad 1 °/₀₀.

3) **Metodo di Conradi.**

La massa batterica, sospesa in soluzione fisiologica, si lascia per più giorni a 37°, indi si filtra per candele Berkefeld.

4) **Metodo di Neisser e Shiga.**

La massa batterica, sospesa in soluzione fisiologica, si riscalda un'ora a 60°, poi si tiene a 37° per uno o due giorni, da ultimo si filtra per candele Berkefeld.

5) **Metodo di Kolle e Wassermann.**

Le patine batteriche, sospese in acqua distillata, si riscaldano un'ora a 60°, poi si sottopongono all'azione di uno scotitore per 4-5 giorni, indi si filtrano.

6) **Metodo di Levy, Blumenthal e Marxer.**

La massa batterica viene disciolta in soluzioni di glicerina all'80 %, o di urea al 10 20 %.

7. **Metodo di Besredka.**

Delle patine di agarcolture di 15-18 ore si sospendono in soluzione di $NaCl$ al 0.75 %, si riscaldano un'ora a 60°, e si essiccano nel vuoto. Un grammo di batteri secchi si polverizza in mortaio di agata insieme con gr. 0.30-0.50 di cloruro sodico secco, e si aggiungono a goccia a goccia tanti cmc. di acqua distillata, finchè il cloruro di sodio non venga a trovarsi nella concentrazione della soluzione fisiologica; si centrifuga, e si decanta; nel liquido soprastante si trovano le sostanze tossiche.

Per qualche specie batterica occorre, prima di centrifugare, riscaldare per 2-3 ore a 60° in bagnomaria.

8. **Metodo di Lustig e Galeotti.**

Si abradono le colonie di agarcolture a piatto di 72 ore, e vi si aggiunge poca soluzione di potassa 1 °/₀, agitando finchè si ottiene un liquido denso, mucilagginoso, trasparente. Questo si versa in un grande vaso contenente 2-3 litri di acqua acidulata con acido acetico o cloridrico allungati: si ottiene così un precipitato fioccoso biancastro, che è un nucleoproteide. Questo si

separa per decantazione, poi i fiocchi si raccolgono sopra un filtro e si lavano accuratamente con acqua distillata. Il precipitato si può disseccare nel vuoto su acido solforico. Per saggiarne le proprietà tossiche ed immunizzanti, si ridiscioglie in soluzione di carbonato sodico 1 %.

F. — DIMOSTRAZIONE DELLE PROPRIETÀ PATOGENE.

Le proprietà patogene dei germi si dimostrano sia inoculando le colture o altro materiale che li contiene, sia i loro prodotti comunque ottenuti, in adatti animali d'esperimento.

1) Inoculazioni (colture liquide, veleni o estratti allo stato liquido, sospensioni, frammenti di organi, pezzetti di colture solide, ecc.).

Le siringhe che si adoperano in batteriologia debbono avere i requisiti di essere facilmente sterilizzabili al calore, possibilmente tutte di vetro.

Molto comoda a tale scopo è la siringa Tursini semplificata e manovrata con la pera Centanni.

La siringa Tursini semplificata è fatta di una canna di vetro lunga circa 20 cm., che porta montato ad un'estremità un ago cavo, e dall'altra è chiusa mediante un tappo di ovatta. Buona parte della canna insieme con l'ago, munito di stiletto, s'introduce in una comune provetta, nella quale essa è fermata per mezzo di un batuffolo d'ovatta che, cerchiandola, fa da tappo alla provetta. Si sterilizza nella stufa a secco.

La pera Centanni è di gomma robusta, ed è chiusa da un corto tubo metallico, che nel suo mezzo ha uno sporto a cerchio, e sotto a questo è solcato a vite; questa assicura una perfetta adesione. Il tubo è tagliato in alto obliquamente, e porta saldato un altro tubo metallico orizzontale (figura 472). Impalmando questa pera e stringendola dopo aver chiuso l'orificio obliquo del tubo col polpastrello del pollice, l'aria contenutavi sfugge dal tubo orizzontale; stringendola prima di chiudere l'orificio e poi allentandola, mentre l'orificio continua ad essere mantenuto chiuso, viene aspirata dell'aria dentro di essa.

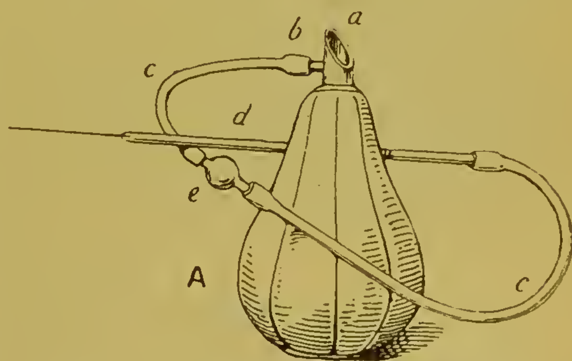


Fig. 472. — Pera Centanni montata con siringa.

Se al tubo orizzontale si attacca un tubo di gomma, ed al capo libero di questo la siringa, il funzionamento è lo stesso. Per aspirare del liquido, anzi tutto si stringe la pera e si chiude col pollice l'orifizio ellittico, poi s'immerge l'ago della siringa in un liquido; allentando allora la pera, il liquido, per l'espansione prodotta, monta nella canna di vetro. Si può interrompere la salita quando si vuole, levando il pollice ed allentando

del tutto la pera. Per ricacciar fuori il liquido, si applica prima il pollice all'orificio, poi si stringe pian pianino la pera.

Con questa siringa si possono fare inoculazioni di quantità approssimative di liquido. Volendo iniettare un volume preciso, si può usare una canna di vetro graduata, terminante con estremità assottigliata e smerigliata per applicarvi il bocciuolo d'un ago mobile; una siringa quindi che maggiormente somiglia alla originaria di Tursini.

Nella originaria siringa Tursini la canna di vetro è costituita del tratto graduato e di una corta ampolla soprastante, separata da esso per mezzo di una strozzatura: l'ampolla, in cui si pone dell'ovatta, porta un forellino nella parete, ed è congiunta per un breve tubo di gomma ad un comune schizzetto. Prima di aspirare il liquido, si chiude col polpastrello di un dito il forellino dell'ampolla; aspirato il liquido nella quantità voluta, si apre il forellino; il quale si richiude novamente prima di spingere il liquido attraverso l'ago nei tessuti.

Buona è anche la siringa graduata di Stroschein. È tutta di vetro; ha un'estremità formata a cupola, con un foro nel mezzo, e l'altra assottigliata e smerigliata, da incastrarsi nel bocciuolo di un ago. La bocca di una corta provettina, più larga della siringa, è fermata intorno al corpo di questa mediante un lungo anello di gomma (fig. 473). Il maneggio è facile a inten-



Fig. 473. — Siringa di Stroschein.

dersi: si spinge la provettina verso il fondo della siringa, fino al segno che si vuole, poi s'immerge l'ago nel liquido e a poco a poco si allenta la provetta; il liquido sale fino a che la provettina non è al termine della corsa. Facendo la manovra inversa, il liquido si può far uscire in quantità piccole e ben determinate.

Utili sono le siringhe graduate fatte di vetro robusto, con ghiera metallica e stantuffo d'amianto, il quale può essere compresso più o meno contro la parete affinchè sempre vi resti ben aderente (siringa di Sclavo): esse terminano o con un attacco smerigliato, cui s'incastra il bocciuolo dell'ago, o con un'olivetta, che può essere per un breve tubo di gomma congiunta con l'ago, provvisto in tal caso non di bocciuolo, ma di un'olivetta esso pure.

Iniezione ed inserzione sottocutanea.

Nel punto in cui si vuol fare l'iniezione, di solito sotto la cute dell'addome o del torace, oppure, nei conigli, anche sotto quella del padiglione dell'orecchio, si tagliano i peli con le forbici curve, umettandoli prima con alcool. La disinfezione della pelle, che talora si può omettere, si fa con soluzione di sublimato 1 ‰, di cui è bene rimuovere poi ogni traccia. Si solleva allora la cute in plica con le dita, o con un paio di pinze, e perpendicolarmente ad essa s'infigge l'ago; si abbandona la plica, e si inietta il liquido. Estratto l'ago, con un batuffolo d'ovatta si fa un rapido e leggiero massaggio.

Per fare l'inserzione sottocutanea di materiale solido, p. es., fili di seta inquinati, dischetti di agarcoltura, ecc., si sceglie la regione dorsale o sacrale, in prossimità della linea spinale: tagliati i peli, si solleva la pelle in plica fra le branche di una pinza, si dà un colpo di forbici, si scolla quanto basta, e nella piccola tasca si pone il materiale; quindi si fa una sutura a cifra otto sopra uno spillo, e si applica un sottile batuffolo d'ovatta idrofila, e sopra un po' di collodio.

Inoculazione percutanea.

Si rade l'animale, badando di non produrre la benchè minima ferita della pelle. Invece di radere, è assai meglio tagliare prima i peli con le forbici e poi ricorrere a un depilatorio.

Un buon depilatorio si prepara aggiungendo a della calce, spenta di fresco, un egual peso di acqua, e facendovi gorgogliare dell'idrogeno solforato fino a che il latte di calce prende una colorazione verdognola.

Uno straterello di questo depilatorio, che è solfidrato di calcio, si distende sulla pelle, vi si lascia circa tre minuti, poi si lava con un pennello bagnato in acqua tiepida ed infine si asciuga. La cute resta così glabra e detersa, senza segni di lesioni.

Il materiale d'infezione vi si strofina sopra per mezzo di un batuffolo di ovatta afferrato con un paio di pinze sterilizzate. Prima di riporre l'animale nella gabbia, si attende che la spalmatura sia bene asciutta.

Inoculazione cutanea o mucosa.

L'inoculazione cutanea si fa per lo più sulla cute del padiglione dell'orecchio. Rasi i peli, fatta la disinfezione e rimossa con acqua sterilizzata ogni traccia dell'antisettico usato, si strofina la cute con alcool od etere, indi si fanno con un piccolo bisturi superficiali scarificazioni. Il materiale si spalma sopra la parte scarificata con una spatolina sterilizzata alla fiamma o con un batuffolo d'ovatta sterilizzato, preso con le pinze.

L'inoculazione mucosa si fa per lo più nella congiuntiva del bulbo oculare, senza disinfettare, o al più avendo lavato il sacco congiuntivale con un po' di soluzione fisiologica sterile; si fanno le scarificazioni, e vi si applica il materiale. Si può anche introdurre nel sacco un batuffolino di ovatta impregnato del liquido in esame, e cucire le palpebre (Negri).

Iniezione endoperitoneale.

L'animale dev'essere tenuto con la testa in giù; si solleva in plica la parete addominale del lato sinistro (non del destro, dove trovasi il fegato, che è voluminoso), s'introduce con un colpo breve l'ago, si abbandona la plica, si spinge il liquido. Vi è, così facendo, pericolo di pungere l'intestino. Perciò si può fare prima un piccolo taglio nella cute, ed allora attraverso la sottile parete muscolare si passa un ago-cannula smusso, adattato alla siringa.

Si sono costruiti anche aghi speciali per fare le iniezioni nel peritoneo, sempre allo scopo di evitare ferite dell'intestino. Stevenson e Bruce hanno

usato un ago curvo, con la punta piena ed il foro di uscita posto nel mezzo della sua concavità. Con questo ago si trapassa da una parte all'altra la plica della parete addominale; abbandonata la plica, e badando che la punta dell'ago rimanga sporgente sulla cute, si fa l'iniezione, indi si risolleva la plica e l'ago si estrae.

Iniezione intravenosa.

Si suol fare nel coniglio, e si sceglie una vena, per lo più la marginale del padiglione auricolare. Si pulisce la pelle strofinandola con ovatta bagnata in acqua calda, si stringe la radice del padiglione affinchè le vene s'inturgidiscano, s'introduce l'ago della siringa nel lume della vena, centripetamente, e si spinge il liquido lentamente, con dolce pressione. Cou un po' di pratica, la mano riesce ad acquistare la sensazioue sicura di aver introdotto l'ago nella vena. In ogni modo, se l'ago è fuori del vaso, alla prima goccia di liquido che si spinge, si sente una certa resistenza, mentre si vede la cute sollevarsi in corrispondenza della punta dell'ago: il liquido va dunque sotto cute; perciò bisogna ritirare l'ago e ritentare la manovra in un'altra vena. Questo, s'intende, ha valore di consiglio per chi deve impratichirsi; ma, se un incidente consimile avvenisse durante un'esperienza d'iniezione intravenosa, l'esperienza non può essere più considerata come genuina.

Similmente si può fare l'iniezione intravenosa nel cane.

Nella cavia si scopre, con un taglio longitudinale del collo, la giugulare, per lo più la sinistra; si isola per un piccolo tratto, e vi si passano intorno due lacci. Si fa l'iniezione introducendo l'ago nella vena fra i due lacci; indi si ritira l'ago, mentre questi si annodano; da ultimo si chiude la ferita cutanea.

Iniezione intracardiaca.

Si fa nelle cavie, secondo l'uso introdotto da Morgenroth L'animale, al quale si tagliano prima i peli presso lo sterno, a sinistra, si fa tenere dritto e fermo quanto più è possibile; un po' a sinistra dello sterno, circa un dito sopra l'appendice ensiforme, dove si sente il più forte impulso del cuore, si introduce l'ago, spingendolo cautamente con lievi movimenti di rotazione. Appena si vede sgorgare il sangue dal bocciuolo dell'ago, s'innesta la siringa, e s'inietta lentamente il liquido, che non dev'essere più di cmc. 1.5-2 al massimo. L'ago si toglie con un tratto brusco.

Iniezione intraoculare.

Si fa per lo più nella camera anteriore, e ci si riesce bene anche nei piccoli animali, così nei conigli come nelle cavie.

Collocato e fermato l'animale sopra un'asse fornita di ordegni da contenzione, si divaricano le palpebre con un piccolo blefarostato; fra le branche di una pinza Gradenigo, che terminano con una leggiera concavità a mezzaluna ed hanno l'orlo finamente granito, si afferra una sottile plica di congiuntiva, poco lontano dal *limbus cornealis*, lateralmente ad esso, e si tira in basso; immobilizzato in tal modo l'occhio, l'ago smontato s'infigge nel contorno superiore della cornea, tenendolo parallelo al piano dell'iride, e si spinge

dentro la camera anteriore; si lascia scolare liberamente l'umor acqueo, circa II-IV gocce, poi s'innesta la siringa, e si iniettano del liquido in esame altrettante gocce quante ne sono uscite di umore acqueo. Secondo Manfredi e Viola la camera anteriore dell'occhio del coniglio ha la capacità di cmc. 0.2-0.3, quella della cavia di 0.1-0.2.

Iniezione intranervosa.

Si fa nel coniglio, radendo i peli e ben pulendo la pelle sull'anca: si palpano, come punti di ritrovo, le prominenze ben manifeste del trocantere e dell'ischio, e s'immaginano congiunte fra loro da una linea. Facendo una incisione della pelle, che muova dal mezzo di questa linea, e per 2-3 cm. si prolunghi quasi perpendicolarmente ad essa, ed approfondendo il taglio nel muscolo sottostante, si scopre il tronco dello sciatico.

Per fare l'iniezione dentro la guaina del nervo, conviene adoperare un ago piegato ad angolo ottuso, la cui punta possa mandarsi nel fondo del taglio, mentre la siringa si tiene comodamente in mano.

Dopo tale iniezione, bisogna cucire il muscolo e la pelle, usando ogni precauzione di asepsi.

Iniezione endocranica.

Si può fare nei conigli, nelle cavie, nei cani. Descriviamola nel coniglio.

Si lega l'animale, col dorso in alto, sopra un apparecchio di contenzione, e se ne immobilizza il capo. Sulla pelle del vertice si strofina dell'alcool, e si tagliano i peli per un certo tratto, di lato alla linea sagittale mediana. A 2 mm. circa da questa e ad essa parallelo, si fa il taglio delle parti molli, per la lunghezza di 2 cm. Si scolla alquanto di qua e di là il periostio, e sull'osso scoperto, nel punto per cui passa una linea ideale che va da un occhio all'altro, si appunta il trapanino Collin. Cautamente si gira il trapano, ritirandone la punta appena la corona ha fatto presa; si gira allora soltanto la corona: quando il disco osseo sta per essere separato dal resto della scatola cranica, si sente diminuire la resistenza sotto il trapano: allora questo si ritira, e, se il disco non viene via incastrato nella corona, si toglie facendo leva con un uncino. Con un ago inclinato a gomito si perfora la dura madre e si iniettano poche gocce di liquido, lentamente. Ciò fatto, si cuce la ferita cutanea; si copre con batuffolino d'ovatta e sopra vi si pennella del collodio.

Iniezione endogastrica.

Il materiale da introdurre si mescola con polvere di biscottini finamente triturati, e se ne forma una pasta ben soda: se ne fanno delle pillole o se ne tagliano dei piccoli dadi, e si dànno a mangiare.

Si può anche introdurre il materiale con fini sonde gastriche; come tali possono servire dei cateteri elastici.

Iniezione endoenterica.

Si solleva una plica longitudinale della parete dell'addome, e vi si fanno passare da parte a parte due fili di seta, alquanto lontani fra loro. Si fa

allora un taglio, compreso fra i due fili, lungo appena mezzo centimetro: un'ansa dell'intestino si affaccia all'occhiello.

Fatta l'iniezione, si tirano e si legano i fili, e sulla piccola ferita si applica un bioccolo d'ovatta e del collodio.

Iniezione intravescicale.

Si fa, negli animali in cui riesce, mediante cateteri elastici, introdotti per l'uretra. Nei piccoli animali è un'operazione aleatoria; nei conigli tuttavia ci si riesce dopo aver fatto parecchia pratica.

Inoculazione intrapolmonare.

Si fa nebulizzando il materiale, versato in adatto polverizzatore, dentro ampie cassette, ermeticamente chiuse, contenenti l'animale da infettare.

2) Sezione degli animali.

È regola generale che gli animali serviti ad esperienze batteriologiche non devono toccarsi con le mani. Essi devono esser presi con molle o tenaglie speciali, fissati col dorso sopra un asse di legno, coperto di carta bibula, e collocati in una bacinella metallica o di porcellana; le zampe divaricate si fissano all'asse per mezzo di spille o chiodi o fili a nodo scorsoio.

Per eseguire un'autopsia a scopo batteriologico, oltre che anatomico, bisogna aver pronti non solo gli strumenti che occorrono per la sezione propriamente detta, ma anse, aghi, uncini di platino, spatole e pinze sterilizzabili alla fiamma, pipette, provette e scatole di Petri sterili, terreni di coltura in provette, vetrini già puliti e talora altri oggetti che già sono stati descritti nei precedenti capitoli.

Gli strumenti che servono per la sezione sono: bisturi, forbici semplici e forbici con una branca smussa, stiletti e sonde, pinze anatomiche. Tutti questi ferri vanno sterilizzati con la bollitura in bacinella di latta smaltata, provvista di coperchio e contenente una soluzione di carbonato sodico all'1-2 %, in quantità sufficiente a ben coprire gli strumenti.

Mentre si fa la sezione, bisogna tener vicino una vaschetta con della ovatta bagnata di alcool per detergere gli strumenti, quando occorre; una bacinella di acido fenico al 5 per cento, per immergerveli quando non servono più; una bacinella di sublimato, per uso personale, se mai capitasse di sporcarsi le mani, non ostante l'osservanza delle norme indicate in principio di questo paragrafo.

Come esempio della sezione dei *piccoli mammiferi* descriviamo quella di una cavia.

Fatti i preparativi già menzionati, dopo avere guardato se esternamente l'animale presenti qualche cosa da notare, si solleva con le pinze una plica di pelle sopra al pube, e con un colpo di forbici vi si fa un piccolo occhiello.

In questo si introduce il bisturi col filo in alto, o forse meglio la branca smussa di una forbice, e si fa un taglio longitudinale della pelle fino alla base del collo.

Se da uno dei lati del taglio si vede alcun segno di essudato sottocutaneo, la pelle si scolla con le branche strette di una pinza sterilizzata alla fiamma, e mediante l'ansa o l'uncino di platino, secondo la consistenza dell'essudato, se ne preleva alquanto per fare delle colture. Indi se ne striscia un po' sopra un portoggetti, facendo la figura di un S (sottocutaneo).

Ciò fatto, si disseca d'ambo i lati la pelle, riprendendo strumenti sterilizzati dalla bacinella, indi si fanno quattro tagli lungo le ascelle e gl'inguini. Scoperte le ghiandole, o se ne estirpa qualcuna e si pone in una scatola di vetro sterile, per le ulteriori operazioni, o queste si fanno in sito. Nel secondo caso, in una di esse ghiandole infiggonsi le branche acute di una pinza sterilizzate alla fiamma ed ancora caldissime, poi si divaricano, e frammezzo si passa un robusto uncino di platino, cercando di asportare qualche frammentino di tessuto, che si semina in un sostrato nutritivo. Di poi si taglia la ghiandola, ed una metà, presa mediante una pinza, si striscia sopra un portoggetti, tracciando una G (ghiandola).

Pungendo qualche vena sottocutanea, se già non è uscito del sangue durante le precedenti manovre, se ne fa uno strisciamento in forma di V (vena).

Se attraverso la parete muscolare si nota la presenza di molto liquido nella cavità addominale, prima di aprirla, si solleva una plica verso il mezzo, e attraverso la sua base infiggesi la punta di una pipetta di Roux; si aspira il liquido, una parte si versa in una provetta sterile, per ricerche speciali, mentre con l'altra si allestiscono colture e da ultimo preparati, strisciando sopra un portoggetti la punta della pipetta, contenente l'ultima goccia, in forma di P (liquido peritoneale).

Dopo ciò si solleva una plica della parete muscolare sopra il pube, vi si fa un occhiello con le forbici e poi un taglio fino all'appendice ensiforme. Tenendo il lembo sinistro sollevato, si scostano le anse intestinali verso il lato opposto, con un uncino smusso, fino a che si scopre la milza. Allora affondando le branche di una pinza, sterilizzate alla fiamma, e badando di non toccare nè la parete addominale, nè l'intestino, si strappa un frammento di milza e si striscia sopra dell'agar solidificato in una scatola di Petri, tracciando linee parallele: lo stesso frammento poi s'introduce in una provetta di brodo. Indi se ne riprende nello stesso modo un altro frammentino, e si fa uno strisciamento in forma di M (milza).

Volendo fare le colture da altri organi parenchimatosi, occorre procedere nella stessa maniera.

Sempre però bisogna fare degli strisciamenti dell'essudato peritoneale, se già non furono fatti, e del fegato: lo strisciamento di questo si fa tracciando una lettera F (fegato).

Dovendo prelevare l'urina, la vescica si punge nel modo stesso che è stato indicato per la parete muscolare dell'addome, allorchè questo contiene del liquido abbondante già manifesto prima di aprire la cavità.

Si passa ora all'apertura del torace. Con le forbici si fa una tacca nell'ipocondrio, d'ambo i lati. In ciascun occhiello s'introduce la branca smussa delle forbici e si recidono le costole con taglio convergente verso il manubrio dello sterno. Si taglia poi l'inserzione diaframmatica, e lo sportello che ne risulta si arrovescia in alto, e si fissa con uno spillo. Se si vuole, si può dare un colpo di forbici anche al manubrio. Essendovi del liquido nel torace, si preleva per le colture e per i preparati, in modo simile a quanto è stato detto

per il liquido peritoneale: gli strisciamenti sui vetrini si fanno in forma di T (torace). Per i prelevamenti dal polmone si procede come per gli organi parenchimatosi in genere, esempio la milza.

Importante è il prelevamento del sangue dal cuore, che si fa nel seguente modo.

Si punge con un coltellino sterilizzato, o con un ago di platino, l'atrio destro. Del sangue che sgorga si fanno colture e strisciamenti su vetrini in forma di C (cuore). Si può anche aprire l'atrio perforandone la parete con le branche acuminate di una pinza passata alla lampada, e poi divaricandole: il sangue, che sgorga copioso, può essere allora prelevato non solo con l'ansa, ma anche con una pipetta.

Altrimenti si può procedere, infiggendo nella parete atriale la punta di una pipetta già sterilizzata e passata lì per lì alla fiamma: così può aspirarsi molto sangue, e servirsene, oltre che per la coltura e per i preparati, anche per altri scopi. È bene in tal caso, ed in altri consimili (per esempio per aspirare molto liquido peritoneale) avvalersi di pipette montate con un congegno simile a quello della siringa di Stroschein (vedi pag. 1304).

Allorchè occorre di estrarre il cervello, bisogna scollare la cute del capo, e il periostio, indi introdurre nelle orbite la branca smussa di una forbice robusta, e rompere a tratto a tratto l'osso, in modo da giungere, d'ambo i lati, fino all'occipite Scoperchiato il cranio, s'incide circolarmente la dura madre, e si estrae finalmente il cervello, che si pone in una scatola Petri.

Quando devesi estrarre il midollo spinale, si recide la colonna vertebrale alla nuca e sopra il sacro; con uno stiletto d'acciaio, munito all'estremità di un batuffolino di ovatta sterile, e introdotto per l'apertura inferiore, si spinge il midollo in alto, mentre dal taglio nucale il capo midollare superiore si afferra con una pinza e si tira; estratto che sia, il midollo si colloca in una scatola di Petri.

Quegli organi che si vogliono adoperare per farne altre colture od estratti, oppure sezioni istologiche, si prelevano dopo ultimate le operazioni finora descritte: si mettono interi, entro scatole di Petri sterilizzate, per il primo scopo; in pezzi, dentro barattoli contenenti del liquido fissatore, per il secondo scopo.

Per l'*autopsia dei volatili*, per esempio di un pollo, si procede in modo simile a quello descritto per i piccoli mammiferi, salvo i seguenti particolari.

Dopo avere spennato il torace e l'addome, con le precauzioni già dette per il taglio dei peli nei mammiferi, si fa un occhiello nella pelle sollevata in plica, al di sopra dell'orificio cloacale, e si fa un taglio longitudinale dal basso all'alto, fino al collo. Si scolla la pelle cautamente, essendo assai delicate le pareti addominali, d'ambo i lati, e si recide la sottile parete aponevrotica che copre i visceri dell'addome, rasente l'orlo della carena; si fanno due tagli longitudinali, leggermente convergenti in alto, nella spessezza dei due muscoli pettorali; sulla guida di essi tagli si recide con forbici robuste la parete ossea, e si ribalta in alto lo sportello, troncandolo, se occorre, in corrispondenza delle clavicole, Così presentasi all'osservazione la cavità toraco-addominale, ed i visceri, che si esaminano come è stato detto per i mammiferi.

Gli strumenti adoperati per la sezione devono essere messi, volta per volta che più non servono, nella soluzione di acido fenico; dalla quale poi rimossi, vengono ribolliti in soluzione di carbonato sodico.

Per il trasporto dei cadaveri si adoperano recipienti di ferro smaltato contenenti miscela di Laplace; alla distruzione di essi, quando sono stati infettati con germi assai pericolosi, come p. es. col bacillo della peste, si provvede mettendoli subito, insieme con la tavoletta su cui sono fissati e la bacinella che li contiene, in un recipiente di ferro smaltato, coprendoveli di acqua e chiudendoli in un'autoclave, che si deve mantenere per lungo tempo in azione.

3) Determinazione della virulenza.

Si prende un certo numero di animali di una specie recettiva al germe di cui si vuole determinare la virulenza; essi debbono avere press' a poco ugual peso.

Una o più anse normali, o diverse frazioni di un'ansa, si stemperano in un liquido sterile, che può essere il brodo o la soluzione fisiologica, avendo cura che le diverse quantità di materiale batterico vengano tutte a trovarsi in un medesimo volume.

Supponiamo, per esempio, di dovere determinare la virulenza di una coltura di vibrione colerigeno. Si distribuisca allora un'ansa normale di agar-coltura di 18 ore in 10 cmc. di brodo; 2 anse in altri 10 cmc. di brodo, 3 anse in altri 10, e poi 4,5... 9 anse sempre in 10 cmc. di brodo. Inoltre si stemperi un'ansa in un cmc. dello stesso liquido, 2 in un altro cmc., e 3 in un altro cmc.

Si abbiano 12 cavie del peso medio di 200 gr.

In ciascuna si inoculi, nel peritoneo, un cmc. di una delle diverse sospensioni, che conterranno rispettivamente 0.1, 0.2, 0.3 ..... 0.8, 0.9, 1, 2, 3 anse normali.

Facciamo il caso che sopravvivano i primi tre animali, il quarto muoia dopo due o tre giorni, il quinto entro le 24 ore, gli altri in tempo assai più breve.

Se si conviene di definire come dose letale la più piccola quantità di germi che fa morire la cavia in 24 ore, essa corrisponde nel capo nostro a mezz'ansa normale. Si dirà dunque che la virulenza dello stipite di vibrione colerigeno sperimentato è di mezz'ansa normale.

Tali esperienze possono farsi naturalmente anche con colture liquide. In tal caso la virulenza si saggia e si indica in cmc.: si dice allora che essa è di mezzo cmc., di $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$ di cmc. ecc.

L'ansa normale è formata da un occhiello, capace di prendere 2 mgr. di massa batterica. Si può preparare per tentativi, servendosi d'una bilancia precisa e sensibile; in commercio si trovano delle bacchettine metalliche, leggermente coniche, lungo le quali si trovano vari segni, e fra essi uno sul quale avvolgendo il filo di platino si ottiene un'ansa normale.

4) Determinazione della dose minima letale dei veleni batterici.

Per determinare la dose minima letale di un dato veleno batterico, si sceglie anzi tutto la specie animale d'esperimento, e si stabilisce il peso medio che gli animali debbono avere, la via d'inoculazione e la qualità ed

il volume del liquido in cui si vuole sciogliere il veleno. Per esempio, volendo eseguire tale determinazione per il veleno difterico, si scelgono delle cavie del peso approssimativo di 250 gr., l'inoculazione si fa per via sottocutanea, il solvente è la soluzione fisiologica, il volume di 4 cmc.

L'azione tossica di un veleno deve essere sempre saggiata con esperienze preliminari.

Facciamo ancora l'esempio del veleno difterico, e supponiamo di avere inoculato alcune cavie con 0.10 cmc., altre con 0.01, ed altre infine con 0.005 di un dato veleno. Muoiano tutte quelle inoculate con 0.10 e con 0.01, e sopravvivano quelle inoculate con 0.005.

Ottenuto questo dato preliminare, in una seconda esperienza si inoculano altre cavie con ciascuna delle dosi di 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005. Poniamo che soccombano tutte le cavie inoculate con la prima dose fra il 1° ed il 3° giorno; quelle inoculate con la seconda fra il 2° e il 4° giorno; quelle con la terza fra il 4° e il 5° giorno; che alcune di quelle inoculate con la quarta dose periscano dopo 6 o più giorni; che nessuna perisca di quelle inoculate con l'ultima dose.

Poichè non è indifferente che le cavie muoiano in un tempo breve o lungo, occorre naturalmente stabilire una convenzione; per il veleno difterico si conviene di definire dose minima letale quella che, nelle condizioni su dette, conduce a morte l'animale fra il 4° e il 5° giorno. Così che, stando all'esempio addotto, diremo che la dose minima letale del veleno esaminato è di 0.008 cmc.

Analogamente si procede per il veleno tetanico e per altre esotossine, come anche per le endotossine, siano allo stato liquido, siano allo stato secco: salvo che nel secondo caso la dose minima letale va espressa in grammi.

Naturalmente cambia, secondo la natura del veleno, la specie animale, il peso degli individui, la via d'inoculazione, la qualità ed il volume del solvente, il tempo nel quale si conviene che debba avvenire la morte dell'animale.

5) **Dimostrazione delle aggressine.**

Le aggressine non sono prodotti batterici tossici nel vero senso della parola. Secondo Bail, sono prodotte dai batteri principalmente quando si trovano nell'organismo animale.

Lo studio delle aggressine si riannoda all'osservazione di Terni e Bandi, i quali nell'essudato peritoneale dei piccoli animali infettati col bacillo della peste riconobbero in sostanza le proprietà che ora si attribuiscono alle aggressine, sopra tutto le proprietà immunizzanti.

Per ottenere delle aggressine, s'inocula nel peritoneo degli animali una dose sicuramente letale o anche più di germi virulenti; l'animale si sacrifica quando è prossimo a morire, e si raccoglie l'essudato peritoneale, torbido, mediante pipette, versandolo volta per volta in tubi. Si allunga l'essudato raccolto, che deve contenere molti germi e pochi elementi cellulari, con ugual volume di soluzione fisiologica; indi si sottopone a lunga centrifugazione, in maniera da ottenere un liquido limpido.

Questo liquido, che per sè stesso in generale è poco o punto tossico, contiene, in condizioni favorevoli d'esperimento, le aggressine. Per distruggere i

pochi germi che vi possono essere rimasti, si tratta il liquido con cloroformio o con toluolo.

Per dimostrare il potere aggressinico di un liquido così ottenuto, se ne mescola una certa quantità con una dose subletale del germe col quale si è sperimentato, e la miscela s'inocula nel peritoneo dell'animale adatto: per controllo, in un altro animale della stessa specie s'inocula il liquido aggressinico soltanto, ed in un terzo soltanto i germi, nelle stesse quantità, ben inteso, che si sono inoculate nel primo animale. Il liquido dicesi aggressinico quando il primo animale soccombe ad un'infezione rapida e grave, mentre gli altri due sopravvivono.

Per alcune specie batteriche, la cui dose letale è straordinariamente piccola, quindi incertamente regolabili le dosi subletali, il potere aggressinico dell'essudato peritoneale si ammette anche quando, morendo l'animale inoculato coi soli germi, quello inoculato con germi e liquido peritoneale soccomba più rapidamente e con le note di un'infezione assai più grave.

Per diminuire le cause d'errore in tali ricerche, bisogna fare ogni esperienza su parecchi animali insieme.

G. — DIMOSTRAZIONE DELLE PROPRIETÀ ANTIGENE.

Negli organi, e principalmente nel siero di sangue degli animali infettati, si possono dimostrare diverse sostanze, aventi per lo più un'azione specifica verso i rispettivi batteri o i loro prodotti. La formazione di tali sostanze può anche essere provocata, anzi in assai maggior misura, inoculando negli animali più volte, ad intervalli opportuni, i batteri uccisi o attenuati, le ultime volte anche virulenti; oppure i loro prodotti, privati o indeboliti nella loro tossicità, le ultime volte anche non modificati. Si chiama *immunizzazione* questo procedimento; le sostanze che si formano nell'organismo animale diconsi in generale *anticorpi*, ed *antigeni* le sostanze batteriche la quale specificamente eccitano l'organismo a produrre gli anticorpi.

L'immunizzazione si può fare inoculando i batteri o i più svariati prodotti batterici sotto cute, nelle vene, nel peritoneo, talora anche introducendoli nel tubo digerente. In alcuni casi basta una sola iniezione per ottenere la formazione di gran quantità di anticorpi. Il più delle volte se ne fanno 3-5; talora qualche diecina e più. Nella parte speciale incontreremo di questi casi.

Di alcuni anticorpi, quindi correlativamente di alcuni antigeni, si può dare la dimostrazione *in vitro*, di altri *in vitro* e *in vivo*, di altri infine soltanto *in vivo*.

Prima di esporre i metodi per dimostrare le reazioni fra antigeni ed anticorpi, descriviamo brevemente due operazioni che ricorrono frequentemente in tal genere di ricerche, cioè il salasso degli animali immunizzati (consideriamo qui soltanto i piccoli animali d'esperimento) e la diluzione dei liquidi.

1) Salasso.

Dalle cavie si può estrarre del sangue mediante la puntura del cuore, eseguita secondo la tecnica dell'iniezione intracardiaca del Morgenroth (v. p. 1306).

Si può, del resto, anche dalle cavie ottenere il sangue con l'apertura della carotide, come si fa nel coniglio.

A tal uopo si fissa l'animale in posizione supina sopra un'asse di contenzione, col muso stirato e leggermente inclinato verso il lato della carotide che si vuol cercare: si tagliano i peli, bagnandoli prima con alcool, s'incide la pelle sulla linea mediana o quasi, per la lunghezza di 3-4 cm. Con uno stiletto smusso o con una sonda scanalata, maneggiandola d'alto in basso e viceversa, si rompe l'aponevrosi di lato alla trachea; si tira di lato, mediante un uncino smusso, il lungo fascio muscolare del collo, e nella doccia fra il fascio e la trachea si scorge la carotide. La si separa dalla vena e dal nervo, che decorrono insieme, e si solleva, passandovi sotto una sonda: si lega in alto con un filo di seta ed in basso si circonda di un altro filo di seta ad ansa, con nodo preparato, ma non stretto. Al di sopra di quest'ansa stringesi la carotide con una pinza anatomica tenuta con la mano sinistra; si pizzica con una pinza a denti di topo, tenuta con la destra, l'avventizia dell'arteria, assicurandosi della presa: un aiuto recide il vaso d'un colpo netto con le forbici, insinuate fra il punto di presa della parete vasale ed il filo annodato in alto; il capo del moncone centrale si devia quanto occorre per dirigere il getto nel vaso di raccolta, poi si allenta la pinza anatomica. Raccolto quanto sangue si vuole, si riserra con la pinza il moncone, e si stringe il nodo del filo posto sotto. Si deterge, se occorre, il campo operatorio, si cuce la pelle, e si protegge la ferita con ovatta e collodio.

In modo simile si può fare il salasso dalla crurale.

Per assicurare maggiormente la sterilità della raccolta, dopo aver messo allo scoperto la carotide, questa si afferra in basso con una pinza Péan e un po' più in alto si passa attorno al vaso un filo di seta, che si annoda senza stringere. Allora, d'un colpo brusco, s'infigge nella parete dell'arteria, al di sopra della stretta della pinza, l'estremità capillare di un lungo tubo piegato a gomito, di cui l'altro capo trovasi nel vaso di raccolta; si annoda il filo di seta sopra il capillare per tenervelo fermo e si toglie la Péan: il sangue vien subito. Terminata l'operazione, il capillare si estrae, mentre si stringe il nodo per chiudere l'arteria. Il resto si fa com'è stato già detto di sopra.

2) Diluzione dei liquidi.

Una operazione di uso frequentissimo nelle ricerche di questo genere è quella di preparare diverse diluzioni dal siero o dai vari liquidi che si devono far reagire fra loro.

Per fare ciò bisogna avere oltre gli strumenti, apparecchi ed oggetti in genere fino ad ora descritti, un buon numero di pipette graduate al centesimo, ed anche al dugentesimo di cmc., della capacità di 1-2-5 cmc., e pipette da 10 e 20 cmc. con bolla, ma in cui la porzione tubulare soprastante porti

una graduazione in decimi di cmc. per un'estensione corrispondente ad 1·2 cmc. Tali pipette, per essere maneggiate senza essere portate alla bocca, possono essere provviste di un congegno uguale a quello delle siringhe di Stroschein (v. p. 1304).

Le pipette devono essere perfettamente pulite ed asciutte, e sterilizzate nella stufa dentro adatti recipienti od involucri. Possono anche essere montate, prima della sterilizzazione, in maniera simile alle siringhe Tursini (v. p. 1303).

Le diluzioni si fanno generalmente in proporzioni semplici, con soluzione fisiologica sterilizzata.

Scegliamo l'esempio del siero.

Supponiamo di voler fare le seguenti diluzioni, in maniera da averne almeno 2 cmc. per ciascuna:

1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000.

Al fondo di una provetta si versa cmc. 0.1 di siero, e vi si aggiungono cmc. 9.9 di soluzione fisiologica: si rimescola bene, inclinando e raddrizzando più volte la provetta.

La soluzione si può fare anche in un matraccetto, nel quale si può ottenere più presto il rimescolamento.

Di questa soluzione di siero 1:100 si pongono in quattro provette:

cmc. 2, 1, 1, 0.5

e vi si aggiunge di soluzione fisiologica, rispettivamente,

cmc. 3, 4, 6.5, 4.5.

In queste diluzioni il siero trovasi sciolto appunto nelle ultime quattro proporzioni su indicate.

Se occorre avere anche diluzioni

1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10000,

si preparano partendo da quella 1:1000. In tal caso però, invece di preparare soltanto 5 cmc. della diluzione 1:1000, se ne preparano 10; cioè si mescola cmc. 1 della soluzione di siero 1 : 100 con cmc. 9 di soluzione fisiologica.

Della diluzione 1:1000 si versano dunque in quattro provette:

cmc. 2, 1, 1, 0.5

e di soluzione fisiologica, rispettivamente,

cmc. 3, 4, 6.5, 4.5.

Questo schema può servire d'esempio anche per diluzioni che si debbano fare in proporzioni diverse.

Ed in generale, se si ha una soluzione iniziale in cui il siero sia allungato nel rapporto $1:m$, e se ne vuol fare una diluzione in cui il siero venga a trovarsi diluito nel rapporto $1:n$, si prendono cmc. m della soluzione iniziale, e vi si aggiungono cmc. $n - m$ di soluzione fisiologica: naturalmente si possono anche mescolare i due liquidi in quantità multiple o summultiple, secondo il bisogno, purchè il rapporto $m : (n - m)$ resti costante.

Esempio:

Si abbia una soluzione di siero 1:50, e se ne voglia preparare una diluzione 1:350. Per far ciò si mescolano

cmc. 50 della soluzione iniziale di siero con cmc. 350 — 50 = 300 di soluzione fisiologica, o, che è lo stesso,

cmc. 5 della soluzione iniziale di siero con cmc. 30 di soluzione fisiologica, ovvero

cmc. 1 della soluzione iniziale di siero con cmc. 6 di soluzione fisiologica, ecc.

3) **Neutralizzazione specifica dei veleni.**

Le tossine batteriche provocano nell'organismo animale la formazione di antitossine. L'azione neutralizzante di queste su quelle si dimostra *in vivo*, e generalmente in questo modo.

Si prende un certo numero di provette, ed in ciascuna si mette una quantità di tossina uguale a parecchie dosi minime letali, per esempio 5-10, talora perfino 100, convenientemente diluita con soluzione fisiologica. Poi si aggiunge a ciascuna provetta una diversa diluzione del siero in esame, in modo che nella serie delle provette vengano a trovarsi quantità decrescenti di siero, p. es. di cmc. 0.1, 0.09, 0.08, 0.01, oppure, secondo i casi, 0.01, 0.009, 0.008 .... 0.001. Con soluzione fisiologica si riportano le miscele in tutte le provette a volume costante, quando a questa condizione non siasi già provveduto nel calcolare le diluzioni della tossina e del siero. Le provette vanno spesso tenute a 37° per un'ora, poi ciascun liquido viene inoculato in una cavia, per lo più sotto cute.

È bene avvertire che ogni serie di esperimenti va ripetuta più d'una volta.

Bisogna inoculare anche uno o più animali con la tossina senza siero, perchè siano testimoni della efficacia della tossina.

Se il siero ha proprietà antitossiche, mentre i testimoni soccombono rapidamente, gli animali che insieme con la tossina hanno ricevuto quantità sufficiente di siero, sopravvivono.

Vedremo nella parte speciale qualche esempio concreto di questo metodo.

Oltre le tossine propriamente dette, vi sono anche dei veleni batterici, la cui azione è dimostrabile *in vitro:* sono principalmente l'*emolisine batteriche.* Ora anche queste hanno azione di antigeni e provocano la formazione d'anticorpi, cioè di antiemolisine.

L'esperienze per dimostrare la neutralizzazione di questi veleni si fanno come quelle per le tossine in senso stretto: salvo che, invece d'inoculare le miscele, si aggiunge ad esse semplicemente l'obbietto sensibile al veleno, che nel caso delle emolisine è dato da una sospensione di London.

Lo schema è sostanzialmente lo stesso già indicato per la dimostrazione delle emolisine; tenendo costante la quantita d'emolisina, si aggiungono nei vari tubi quantità gradatamente crescenti o decrescenti di siero antiemolitico.

4) Agglutinazione.

Si adoperano colture su agar di 18-24 ore, e si sospendono in soluzione fisiologica, usando le seguenti cautele.

Con l'ansa di platino, bagnata nell'acqua di condensazione, si abrade la patina, strisciandovi sopra leggermente a zig-zag, dal basso all'alto e viceversa, e cercando di raccogliere tutta la massa al fondo. Allora vi si versano pochissime gocce di soluzione fisiologica, e si ritorna con l'ago a stemperare la poltiglia, in maniera da renderla uniforme. In ultimo si aggiunge a poco a poco altra acqua fisiologica, agitando sempre, fino a che non si sono ottenuti circa 5 cmc. di sospensione batterica. Mescolando i liquidi in cui sono state raccolte le patine di più agarcolture, si possono avere 10-20, quanti cmc. si vuole di sospensione batterica.

D'altra parte si preparano le diluzioni del siero, ma in concentrazioni doppie di quelle che si vogliono saggiare.

Per esempio, volendo saggiare il siero diluito 1:100, 1:500, 1:1000, si preparano diluzioni rispettivamente di 1:50, 1:250, 1:500.

Quando tutto è pronto, di ciascuna diluzione si versa un cmc. in una provetta, le varie provette essendo disposte ordinatamente. Ad ogni diluzione si aggiunge un cmc. della sospensione batterica.

Bisogna non trascurare i due controlli, necessari per esser sicuri da un lato che i batteri adoperati non presentino il fenomeno dell'agglutinazione spontanea, dall'altro che siano ben agglutinabili.

Perciò:

1° in una provetta si mette un cmc. di sospensione batterica e vi si aggiunge un cmc. di soluzione fisiologica;

2° in un'altra provetta si mette un cmc. di sospensione batterica e vi si aggiunge una diluzione sicuramente attiva di un siero agglutinante, già precedentemente studiato e titolato, e conservato come siero di riscontro.

Si può anche procedere in altro modo per ciò che spetta alla massa batterica da aggiungere alle diluzioni del siero.

In tal caso, versate le varie diluzioni di siero nelle provette, in ciascuna di esse si stempera un'ansa normale, per qualche germe anche due, di patina su agar.

Un altro metodo, più sbrigativo, è il seguente.

Si prepara una sospensione batterica nella stessa maniera di sopra indicata per il primo metodo. Un cmc. di essa si versa in una provetta, e il resto si allunga con soluzione fisiologica nel rapporto 1:2.

Del siero si prepara una sola diluzione, corrispondente al doppio del primo rapporto che si vuole saggiare.

In una provetta si versa un cmc. della sospensione più densa, e in tutte le altre, tante quante sono le diluzioni di siero che si vogliono saggiare (meno la prima, s'intende) un cmc. della sospensione meno densa. Ciò fatto, si versa nella prima provetta un cmc. dell'unica diluzione di siero preparata; si agita, e della miscela si passa un cmc. nella seconda provetta; agitata questa, se ne passa un cmc. nella terza, e così via.

Procedendo in questo modo, il siero viene ad essere in ogni provetta diluito due volte rispetto alla precedente.

Così, se la soluzione iniziale del siero adoperata è di 1 : 50, nella prima provetta essa viene allungata due volte, quindi in essa il siero è diluito nel rapporto 1 : 100; similmente nella seconda trovasi diluito 1 : 200, nella terza 1 : 400, nella quarta 1 : 800, e così via. La massa batterica è uguale in tutte le provette.

In alcuni casi possono adoperarsi, invece delle colture su agar, colture in brodo; ed anche, invece di colture vive, colture morte; alcuni di questi preparati, come vedremo, sono entrati nella pratica sierodiagnostica.

Comunque si proceda nel fare le diluzioni del siero e nel mescolare i batteri con esse, sempre le provette si tengono 2 ore a 37°, poi si ritirano e si osservano una per una, dal basso all'alto, tenendole inclinate, e notando in quale di esse vedonsi dei fiocchettini, che sono segno dell'agglutinazione.

L'agglutinazione ha doppia importanza, sierodiagnostica e batteriodiagnostica, come sarà spiegato a suo luogo.

Nel primo caso trattasi di diagnosticare la malattia, ricercando l'eventuale azione agglutinante del siero di un malato sopra un dato bacillo, ben conosciuto, per vedere se la malattia sia causata da questo; nel secondo caso trattasi di riconoscere se un germe isolato appartenga ad una data specie batterica, ed allora si ricerca se il germe isolato è agglutinabile da un siero agglutinante specifico, di titolo conosciuto.

5) **Precipitazione.**

Allorchè, invece di adoperare batteri vivi o morti, se ne adoperano i prodotti, e questi si mescolano col siero di animali immunizzati, si ha un fenomeno simile all'agglutinazione, e dicesi precipitazione.

Ai filtrati di colture batteriche in sostrati liquidi aggiungendo del siero, e del resto operando in modo simile a quello detto per l'agglutinazione, si osserva un intorbidamento o la formazione di fiocchettini.

Il fenomeno della precipitazione avviene anche fra le soluzioni di sostanze proteiche svariatissime ed il siero di animali trattati con esse in modo analogo ai processi d'immunizzazione. In tali casi i liquidi reagenti devono essere limpidi e si mescolano in rapporti che si scostano da quelli in uso per l'agglutinazione: appunto perchè i liquidi reagenti devono essere limpidi, il fenomeno della precipitazione si dichiara non solo colla formazione di precipitato, ma anche per il semplice intorbidamento delle miscele.

Esso inoltre avviene per lo più rapidamente, entro pochi minuti, anche a temperatura di stanza.

Riferiamo alcuni esempi utili.

Titolazione di un siero precipitante. — Si preparino varie diluzioni del siero precipitante, e siano 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, e si versino 0.2 cmc. di ciascuna in altrettante provettine alte circa 4-5 cm., del diametro di 0.7-0.8 cm. In ognuna si aggiungano 0.2 cmc. di una diluzione 1 : 100 dell'antigene da esaminare.

Si facciano inoltre i seguenti controlli:

Siero precipitante . . . . 0.2 + soluzione fisiologica 0.2
Antigene . . . . 0.2 + id. 0.2
Siero normale della stessa specie animale
onde proviene il siero precipitante . 0.2 + antigene. 0.2

Determinazione della diluzione limite dell'antigene. — Si preparino dell'antigene le diluzioni 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:100,000, e di ciascuna si versino 0.2 cmc. in altrettante provettine. Vi si aggiunga in ognuna 0.2 cmc. di siero precipitante.

Si facciano i seguenti controlli:

Siero precipitante		0.2 +	soluzione fisiologica	0.2
Antigene	1:1	0.2 +	id.	0.2
»	1:10	0.2 +	id.	0.2
»	1:100	0.2 +	id.	0.2
. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .
»	1:100,000	0.2 +	id.	0.2

Antigene	1:1	0.2 +	siero normale della stessa specie animale onde proviene il siero precipitante	0.2
»	1:10	0.2 +	» »	0.2
»	1:100	0.2 +	» »	0.2

Dimostrazione della specie di sangue a scopo forense. — Le macchie di sangue da esaminare si asportano, con operazioni varie da caso a caso, del resto facilmente immaginabili, e si sciolgono in soluzione di $NaCl$ al 0.85 %: si deve ottenere una soluzione che sia approssimativamente di 1 : 1000. Ciò si riconosce facendo bollire un cmc. della soluzione ottenuta ed aggiungendovi una goccia di acido nitrico al 25 %: si deve formare un leggiero intorbidamento opalescente, senza precipitato.

Il siero precipitante si ottiene da conigli più volte iniettati con siero umano.

Le prove si allestiscono così:

Soluzione esaminanda	cmc. 1 +	Siero precipitante	cmc.	0.1
» »	» 1 +	Siero norm. di coniglio	»	0.1
Soluzione di sangue umano precedentemente dissecc. 1:1000	» 1 +	Siero precipitante	»	0.1
Soluzione esaminanda	» 1 +	Soluzione fisiologica	»	0.1
Siero precipitante	» 1 +	Soluzione fisiologica	»	0.1

Dimostrazione della specie di carne alimentare a scopo bromatologico. — Si fa un estratto della carne da esaminare, triturandola e sciogliendola in soluzione fisiologica, indi filtrando il liquido attraverso candela Berkefeld; questo non deve mai contenere più del 3 ‰ di albumina carnea; e se di più ne contiene, si allunga quanto conviene. Il criterio per giudicare con approssimazione su questo punto è lo stesso che è stato di sopra indicato per la « Dimostrazione della specie di sangue ».

Il siero precipitante si ottiene da un coniglio inoculato ripetute volte, ad intervalli di 5-7 giorni, con un estratto della specie di carne che si vuole riconoscere, o con siero dello stesso animale.

L'esperienza si fa nel modo descritto per la « Dimostrazione della specie di sangue ».

Reazione zonale di A. Ascoli. — Un caso particolare della tecnica di precipitazione è quello che si riferisce alla così detta reazione zonale di A. Ascoli, quale si può adoperare nella diagnosi serologica dell'infezione carbonchiosa.

Per eseguirla si fa uso di una provetta munita di piede e sormontata da un imbutino di vetro, che porta un filtro d'amianto, ed ha un lungo collo inferiormente curvato in modo che la sua apertura poggi contro la parete della provetta. Si mette il siero precipitante specifico nella provetta; si versa sul filtro la sospensione del materiale sospetto di contenere il precipitinogeno carbonchioso: se questo esiste, si forma nella superficie di contatto fra i due liquidi un anello di precipitazione. Per i particolari, vedi quanto è detto a proposito del B. del carbonchio.

6) **Batteriolisi.**

Questo fenomeno si dimostra *in vitro* nel seguente modo.

Si preparano le varie diluzioni del siero specifico, già inattivato, e si versa un cmc. di ciascuna in altrettante provette. Si prepara inoltre una soluzione di siero normale fresco (che contiene il così detto complemento), in modo che questo venga a trovarsi disciolto nel rapporto 1:10 nel volume totale del liquido contenuto in ciascuna provetta. Può adoperarsi del siero di cavia, o anche siero di coniglio o di altro animale, opportunamente scelto secondo i casi.

Si può fare, per esempio, così:

Supponiamo che si voglia studiare il potere batteriolitico di un siero nelle diluzioni

1:20, 1:50 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000.

Si preparano allora altrettante diluzioni di siero:

1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000.

Di ciascuna si mette un cmc. in una provetta.

In ogni provetta si aggiunga un cmc. di siero fresco diluito 1:5.

Nelle varie provette si avrà dunque il siero disciolto nel rapporto di 1:10; quello specifico nei rapporti voluti di

1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000.

Ciò fatto, si stempera in ciascuna provetta un'ansa normale di una tenue sospensione ottenuta da recente coltura su agar del germe su cui si vuole saggiare l'azione del siero specifico.

Bisogna aggiungere tre controlli:

1° in una provetta si versano 2 cmc. di soluzione fisiologica, e vi si stempera un'ansa normale della coltura;

2° in un'altra provetta si versa un cmc. della diluzione del siero di cavia, ed uno di soluzione fisiologica, e vi si stempera del pari un'ansa normale di coltura;

3° in una terza provetta si versa un cmc. della diluzione più concentrata di siero specifico ed un cmc. di soluzione fisiologica, e vi si stempera un'ansa normale di coltura.

Si può anche procedere altrimenti, secondo i casi.

Per esempio, invece di stemperare un'ansa normale di sospensione batterica in ciascun tubetto, vi si può versare un volume determinato di essa. Allora la sospensione deve farsi assai più tenue, p. es. tale che contenga

un'ansata di agarcoltura in 100-500 cmc., ed il complemento va sciolto in concentrazione doppia di quella indicata nel primo metodo.

Le prove si allestiscono aggiungendo ad un cmc. di ciascuna delle diluzioni del siero specifico ½ cmc. di sospensione batterica e ½ cmc. di soluzione di complemento.

Qualunque sia il metodo col quale si allestisce l'esperienza, in ogni provetta si aggiungono due gocce di brodo; le provette vanno tenute un'ora a 37°, indi da ciascuna si allestisce una coltura in agar a piatto, seminandovi un'ansa normale. Le scatole Petri seminate si lasciano in termostato per 24-72 ore, secondo i casi; dopo di che si nota se vi son nate delle colonie o pur no, ed in caso positivo si contano.

Il fenomeno della batteriolisi può osservarsi anche in gocce pendenti, preparandole dai liquidi che sono già stati un'ora a 37°: si osservano allora, come accade per i vibrioni del colera, accumoli di granulini, risultanti dal disfacimento deg'individui batterici.

In vivo la batteriolisi dimostrasi, preparando le diluzioni del siero specifico in un cmc. di brodo sterile, stemperandovi parecchie, per lo più 10, dosi minime letali di coltura, senza aggiungervi siero fresco di cavia, ed inoculando i vari liquidi nel peritoneo di altrettanti animali. Bisogna naturalmente inoculare nello stesso tempo la medesima quantità di coltura sospesa in brodo semplice nel peritoneo di uno, o meglio di due o più animali testimoni.

Mezz'ora ed un'ora dopo l'inoculazione, fatto un occhiello nella cute dell'addome di ciascun animale, attraverso la parete muscolare s'infigge una pipetta capillare per aspirare qualche goccia di liquido. Di questo si fanno colture a piatto, e preparati a goccia pendente.

L'effetto ultimo dell'inoculazione sulla vita degli animali è in certi casi anche prova, benchè indiretta, della batteriolisi; in quanto che, mentre gli animali testimoni soccombono rapidamente, quelli che insieme con la coltura hanno ricevuto il siero in dose sufficiente sopravvivono.

7) Fagocitosi e potere opsonico.

Per osservare e studiare i particolari di questo fenomeno *in vitro*, bisogna procurarsi dei leucociti.

Questi si possono ottenere inoculando nel peritoneo di una cavia 5-6 cmc. di brodo sterile, nel quale si è sciolto poco prima, a temperatura d'ebollizione, una punta di coltello di aleuronato del commercio. Il giorno dopo l'inoculazione, si sacrifica la cavia dissanguandola, e dalla cavità peritoneale si pipetta il liquido torbido, allungandolo subito con parte uguale di soluzione fisiologica che contenga 1.5 % di citrato sodico. Si lasciano sedimentare per alcuni minuti le particelle grosse, indi si decanta il liquido, e si centrifuga; poi si pipetta il liquido soprastante e si sostituisce altra acqua fisiologica; si ricentrifuga, e da ultimo si aspira il liquido, lasciandovi al fondo solo poche gocce, che contengono i leucociti. Prima di servirsi di questa sospensione, si guardi al microscopio per esser sicuri che vi siano abbastanza leucociti. Per riconoscere se i leucociti ottenuti sono vivi, si ricorre alla colorazione vitale col turchino metilene; se il loro nucleo resta scolorato, vuol

dire che ha azione riducente, quindi i leucociti son vivi. Per eseguire tale prova si adopera una soluzione di turchino di metilene rettificato Grübler così preparata: un grammo di colore si scioglie in 100 cmc. di soluzione fisiologica calda, che dopo raffreddata si filtra; al momento di servirsene, si allunga ancora con altrettanta soluzione fisiologica (Mari).

Si prepari la sospensione batterica, non molto densa: si allunghi tanto che, facendone dei preparati colorati per strisciamento, questi non mostrino, per ogni campo microscopico di un sistema ad immersione, più di 30-40 germi.

D'altra parte si tenga pronto il siero o le diluzioni di esso, qualora occorra di studiarle.

Usando il metodo di Wright e Douglas, si procede così. Si prende una pipetta, che sulla parte capillare ad una certa distanza dalla punta, presso a poco corrispondente alla capacità d'una goccia, porti un segno; si aspira la sospensione dei leucociti fino al tratto segnato, poi si aspira un po' d'aria, poi di nuovo altra sospensione fino al segno, poi altra aria; con la stessa regola si aspira la terza volta il siero, e la quarta volta la sospensione batterica. Ciò fatto, le quattro porzioni liquide si fanno cadere in un vetrino d'orologio, dove si rimescolano; la miscela si aspira nella pipetta, poi si ricaccia fuori un'altra volta; in ultimo si aspira di nuovo, e la pipetta, chiusa alla lampada, si pone a 37° per 20' o più, secondo la natura dei germi.

Trascorso il tempo, si versa il liquido sopra un vetrino, e con esso si fanno dei preparati su portoggetti. Per eseguire gli strisciamenti si adopera un pezzo di vetrino portoggetti, così ottenuto: s'intaccano col diamante i punti di mezzo dei due margini lunghi del portoggetti, quindi si prende il vetrino con le due mani e si cerca di spezzarlo lungo il tratto segnato col diamante. Se la rottura avviene come si desidera, una delle due metà è leggermente concava; si rompono allora anche gli angoli acuti sui quali termina il taglio curvo.

È appunto quest'orlo concavo del vetrino che s'intinge nel miscuglio, e col quale si fanno gli strisciamenti, possibilmente a zig-zag. I leucociti si accumulano sopra tutto lungo i margini dello strisciamento.

Si fanno dei preparati colorati col metodo Romanowsky, secondo la maggior parte degli autori: la tionina fenica è di preparazione e di uso più semplice, e si presta bene allo scopo (De Blasi).

Al microscopio si osserva con lente ad immersione: si scorre il preparato contando 50-100 leucociti ed il numero dei germi inclusi: questi dati servono per calcolare l'indice fagocitario e poi l'indice opsonico, come sarà detto nella seconda parte (Batteriologia generale).

8) Deviazione e fissazione del complemento.

Questa reazione fu trovata da Bordet e Gengou, onde porta anche il nome di fenomeno di Bordet e Gengou.

Un antigene batterico ed il rispettivo anticorpo, messi insieme, sono capaci di *fissare* il complemento che vi si aggiunge. Il complemento così *fissato* non ha più facoltà di integrare degli ambocettori litici, quindi è come se fosse *deviato* dal sistema litico.

L'esperienza dunque consiste nell'unire in un primo tempo l'antigene, l'anticorpo e il complemento; e nell'aggiungervi in un secondo tempo un ambocettore litico insieme con gli elementi cellulari su cui questo può spiegare la sua azione dissolvente.

Antigene. — L'antigene può essere dato o dai batteri vivi, o dai batteri morti, o meglio da loro prodotti variamente ottenuti, per esempio autolizzati.

Bisogna tener presente che i batteri o i loro prodotti, quando sono in una certa quantità, fissano il complemento anche indipendentemente dalla presenza del rispettivo anticorpo: onde la necessità di titolarlo avanti, cioè di ricercare qual'è la massima quantità di esso che non fissa il complemento. Per eseguire poi l'esperienza di Bordet e Gengou, si userà la metà del valore così trovato.

Sarà dato più oltre in questo paragrafo lo schema della titolazione.

Alcuni antigeni, una volta titolati, si possono conservare per un certo tempo in ghiacciaia: altri invece devono essere preparati e titolati volta per volta.

Anticorpo. — Questo si trova, ossia si ricerca nel siero di animali immunizzati, o di malati o convalescenti di varie malattie. Il siero dev'essere precedentemente riscaldato mezz'ora a 55°, cioè inattivato.

Si mescola con l'antigene in quantità varie, per alcune infezioni in quantità determinate e fisse.

Complemento. — Si ottiene salassando una cavia e separando il siero dal coagulo sanguigno. Il siero dev'essere adoperato entro le 24-48 ore, e nel frattempo dev'essere conservato in ghiacciaia.

Ambocettore litico. — Si sceglie un ambocettore emolitico, come quello che permette un facile e pronto apprezzamento dei risultati. Per lo più il siero emolitico, che contiene l'ambocettore, si ottiene da conigli inoculati 3-4 o più volte sotto cute con poltiglia corpuscolare di sangue lavato di pecora o di bue: s'inoculano ogni volta circa 5 cmc. di sospensione, e l'intervallo fra due inoculazioni consecutive è di 5-7 giorni.

Il salasso si fa 4-5 giorni dopo l'ultima inoculazione, dopo essersi accertati con piccoli saggi di sangue, prelevato da una vena del padiglione dell'orecchio, che il potere emolitico ha raggiunto un alto valore.

Il siero, appena separato, dev'essere inattivato e titolato come vedremo dopo. Si distribuisce in tanti tubetti o pipette, che si chiudono alla lampada. e si mantiene in ghiacciaia: in tali condizioni conserva il suo potere immutato per mesi e mesi.

Elementi cellulari dissolvendi. — Poichè, come è stato detto, si usa nell'esperienza un ambocettore emolitico, bisogna usare, come obbietto da dissolvere, le emazie. A tal uopo si defibrina del sangue di pecora (o di bue, se l'ambocettore emolitico è stato ottenuto con l'inoculazione di sangue di bue), se ne separa il siero, e la poltiglia corpuscolare si lava più volte, alternatamente centrifugando e pipettando il liquido soprastante, fino a che questo non rimane limpido ed incoloro. Della poltiglia corpuscolare, separata dall'ultimo liquido di lavaggio, si fa una sospensione al 5 % in soluzione di $NaCl$ al 0.85 % (sospensione di London).

Titolazione del siero emolitico. — Si preparano di tal siero varie diluzioni, per es.: 1:20, 1:40, 1:100, 1:200, 1:400, 1:1000.

D'altra parte si preparano soluzioni di complemento nel rapporto 1:10 e la sospensione di London.

In tante provette si versano 1 cmc. di ciascuna diluzione di siero emolitico, 1 cmc. di soluzione di complemento ed 1 cmc. di sospensione di London. Si aggiungono tre controlli: uno con la sospensione di London e la minima diluzione di siero emolitico, senza complemento; un altro con la sospensione ed il complemento, senza siero emolitico: un terzo con la sola sospensione di London. Si riporta in tutti i tubi il volume a 5 cmc., aggiungendovi soluzione fisiologica.

Si può fare l'esperienza anche adoperando ½ cmc. di ciascuno dei tre reattivi, e riportando il volume a 2.5 cmc.

Si mettono i tubi in termostato. Dopo mezz'ora si ritirano, e si notano subito i risultati.

Ecco uno schema di titolazione, nel quale si trova anche la colonna indicante i supposti risultati.

TABELLA 103.

Num.	Siero emolitico diluito	Complemento diluito 1:10	Sospensione di London	Soluzione fisiologica	Emolisi
1	1: 20 cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	cmc. 2	completa
2	1: 40 » 1	» 1	» 1	» 2	»
3	1: 100 » 1	» 1	» 1	» 2	»
4	1: 200 » 1	» 1	» 1	» 2	»
5	1: 400 » 1	» 1	» 1	» 2	»
6	1: 1000 » 1	» 1	» 1	» 2	tracce
7	1: 20 » 1	—	» 1	» 3	0
8	—	cmc. 1	» 1	» 3	0
9	—	—	» 1	» 4	0

L'emolisi si apprezza ad occhio nudo, tenendo conto del colore del liquido e della quantità di emazie depositate al fondo dei tubi.

Dicesi *completa*, quando il liquido è rosso rubino e manca ogni traccia di sedimento; le espressioni *quasi completa, incompleta, tracce* denotano gradi via via minori di emolisi, riconoscibili alla minore intensità della laccatura ed alla maggiore quantità di sedimento.

La *diluzione limite* attiva del siero è la massima fra quelle che nelle condizioni dette produce emolisi completa. Nel caso riferito sarebbe quella del n. 5: e siccome la diluzione originaria di 1:400 si viene a trovare in ultimo allungata altre cinque volte, diremo che la diluzione limite del siero esaminato è di 1:2000.

Titolazione dell'antigene. — Si abbiano già pronti un siero emolitico del titolo 1:2000, il complemento e la sospensione di London.

Supponiamo di voler titolare un antigene rappresentato da corpi batterici essiccati: se ne faccia una sospensione in soluzione fisiologica, per es., di 5 mg. in 2.5 cmc. Di tale sospensione si facciano, nel solito modo, varie diluzioni: p. es., 1: 2, 1: 5, 1: 10, 1: 20, 1: 50, ecc. Un cmc. di ciascuna si versi in altrettante provette, vi si aggiunga un cmc. complemento, e si riporti in tutte il volume a 3 cmc. con soluzione fisiologica. Si aggiungano anche i vari controlli, quali sono indicati nello schema sottostante.

Le provette, ben mescolate, si tengono un'ora a 37°, indi si ritirano e si aggiunge in ciascuna un cmc. di sangue ed un cmc. di una diluzione del siero emolitico dieci volte più forte della diluzione limite, in modo che, in ultimo, essendo in ogni tubo il volume totale di 5 cmc., il siero si trovi in una diluzione doppia del titolo limite.

Si rimescolano allora le provette, e si ripongono a 37°: dopo 15-20′ si ritirano dal termostato, si tengono 18-20 ore in ghiacciaia, poi si notano i risultati.

Ecco lo schema.

TABELLA 104.

Numero	Antigene (sospens. 2 %) diluito	Complemento diluito 1 : 10	Soluzione fisiologica	Siero emolitico diluito 1 : 200	Sospensione di London	Emolisi
1	1 : 1 cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	0
2	1 . 2 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	0
3	1 : 5 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	tracce
4	1 : 10 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	quasi compl.
5	1 : 20 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	completa
6	1 : 50 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	»
7	1 : 100 » 1	» 1	» 1	» 1	» 1	»
8	1 : 1 » 1	—	» 2	» 1	» 1	0
9	—	cmc. 1	» 2	» 1	» 1	0
10	—	—	» 3	» 1	» 1	0
11	—	—	» 4	—	» 1	0
	Miscele da tenere un'ora a 37°.			Liquido da aggiungere dopo ritirate le provette dal termostato.		

La prima diluzione di antigene che per sè non fissa il complemento è 1: 20. Nelle esperienze bisognerà dunque adoperare una diluzione due volte maggiore, cioè 1: 40 (v. pag. 1323).

Bisogna però anche assicurarsi che tale diluzione dell'antigene, in presenza di sieri normali, non fissi il complemento: perciò si ripete l'esperienza, tenendo fissa la diluzione di antigene 1 : 40, ed aggiungendovi in diverse provette vari sieri normali diluiti 1 : 5, secondo il seguente schema, in cui figurano anche i necessari controlli.

Tabella 105.

Num.	Antigene diluito 1 : 40	Sieri normali diluiti 1 : 5	Complem. diluito 1 :10	Soluzione fisiologica	Siero emolitico diluito 1 : 200	Sospensione di London	Emolisi
1	cm. 1	siero I cmc. 1	cmc. 1	—	cmc. 1	cmc. 1	completa
2	—	» » 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	»
3	cmc. 1	siero II cmc. 1	» 1	—	» 1	» 1	»
4	—	» » 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	»
5	cmc. 1	siero III cmc. 1	» 1	—	» 1	» 1	»
6	—	» » 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	»
..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..
a	cmc. 1	—	cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	cmc. 1	»
b	» 1	—	—	» 2	» 1	» 1	0
c	—	—	cmc. 1	» 3	—	» 1	0
d	—	—	—	» 3	cmc. 1	» 1	0
e	—	—	—	» 4	—	» 1	0
	Miscela da tenere un'ora a 37°				Liquidi da aggiungere dopo ritirate le provette dal termostato		

Se la diluzione dell'antigene 1 : 40 dà in presenza di alcuni sieri normali il fenomeno della deviazione, bisogna ritentare diluzioni maggiori, per es., 1 : 45, 1 : 50, ecc.

Secondo lo stesso schema si saggia se la stessa dose di antigene in presenza di sieri specifici dà il fenomeno di Bordet e Gengou.

Supponiamo che tutti i saggi preliminari vadano bene, e diamo subito lo schema della

Esecuzione dell'esperienza. — Si abbiano pronti i cinque reattivi convenientemente preparati com'è stato detto.

Il modo di eseguire l'esperienza, dopo i chiarimenti già dati, risulta evidente dal seguente specchietto, nel quale appaiono utilizzati gli esempi parziali già fatti,

Tabella 106.

Num.	Antigene diluito 1 : 40	Siero diluito 1 : 5	Complem. diluito 1 : 10	Soluzione fisiologica	Siero emolitico diluito 1 : 200	Sospensione di London	Emolisi
1	cmc. 1	Siero in esame cmc. 1	cmc. 1	—	cmc. 1	cmc. 1	0
2	—	» 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	completa
3	cmc. 1	Siero di contr. posit. cmc. 1	» 1	—	» 1	» 1	0
4	—	» 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	completa
5	cmc. 1	Siero di contr. negat. cmc. 1	» 1	—	» 1	» 1	»
6	—	» 1	» 1	cmc. 1	» 1	» 1	»
7	cmc. 1	—	» 1	» 1	» 1	» 1	»
8	—	—	» 1	» 2	» 1	» 1	»
9	—	—	—	» 3	» 1	» 1	0

Da questo specchietto si vede che sono stati omessi alcuni controlli che sono ora superflui, dopo i risultati ottenuti nelle ricerche preliminari. Si vede altresì che ogni volta che si deve ricercare se in un siero (n. 1-2) esistano anticorpi fissatori del complemento, bisogna contemporaneamente rifare la prova con un siero che abbia già dimostrato in precedenti ricerche di contenerne (n. 3-4: controllo positivo) e con un siero normale (n. 5-6: controllo negativo).

Nell'esempio fatto la reazione risulta positiva per il siero in esame.

Il fenomeno di Bordet e Gengou è una reazione immunitaria, quindi specifica: è stato osservato per diverse infezioni, come sarà detto a suo luogo.

La *reazione di Wassermann* per la sifilide è una filiazione di quella di Bordet e Gengou, benchè siasi visto che il suo fondamento scientifico è diverso.

Si eseguisce la reazione di Wassermann in maniera simile a quella descritta per il fenomeno di Bordet e Gengou; soltanto l'antigene è rappresentato da un estratto acquoso di fegato di un eredosifilitico. Il fegato dovrebbe contenere delle spirochete, ma si è visto che i fegati di feti luetici, anche se non dimostrino di contenere spirochete, possono fornire dei buoni antigeni. Del resto alcuni fegati normali, come anche il cuore di cavia, sono stati riconosciuti provvisti di proprietà antigena.

Si possono usare anche estratti alcoolici invece degli acquosi.

L'estratto si prepara così. Un pezzo di fegato si tritura in un mortaio, mescolandovi una piccola quantità di sabbia di quarzo. Si aggiungono quindi 4 parti di soluzione fisiologica e mezza parte di soluzione di fenolo al 5 % ed il miscuglio si sottopone per parecchie ore all'azione di uno scotitore. Indi si centrifuga in modo che si depositino la sabbia e i frammenti di parenchima, ed il liquido soprastante non dimostri particelle visibili ad occhio nudo, pur rimanendo più o meno torbido.

Si titola come un antigene batterico, cercando di stabilire la dose ottima (che in ogni caso non deve essere mai maggiore della metà di quella che per sè stessa devia il complemento) in presenza della quale nessun siero normale dà la deviazione, mentre la dànno i sieri sifilitici. La titolazione dunque va contemporaneamente fatta con parecchi sieri normali e con parecchi sieri sicuramente sifilitici.

La *reazione di Ghedini* (conosciuta sotto i nomi di *Weinberg* e *Parvu*, che la osservarono dopo Ghedini), serve per la diagnosi di cisti d'echinococco, e si eseguisce pure come quella tipica di Bordet e Gengou. Come antigene si adopera il liquido limpido di cisti di bue o di pecora, il quale dev'essere adoperato nella stessa giornata in cui l'animale viene ucciso, o al più il giorno dopo. Solo bisogna avvertire che per ogni siero, cioè tanto per il siero sospetto quanto per i sieri di controllo, la prova dev'esser fatta con tre diverse diluzioni dell'antigene; e precisamente, sopra un volume totale di 5 cmc., in una prova vanno messi 0.3 cmc. di liquido, nell'altra 0.7 cmc., nella terza 1 cmc. Si scelgono questi valori, od altri poco differenti appunto perchè, dovendosi adoperare liquidi cistici freschi, sarebbe troppo lungo il farne la titolazione precisa volta per volta. È utile anche del siero in esame usare varie diluzioni, da 1:2.5 a 1:5.

9) Reazione meiostagminica.

Questa reazione, ideata da M. Ascoli, avviene allorchè si mescolano insieme soluzioni di un antigene e del rispettivo anticorpo, in rapporti determinati: per effetto dell'unione delle due sostanze, il liquido che le contiene subisce un mutamento nella sua tensione superficiale. Appunto questo mutamento si cerca di riconoscere con la reazione di Ascoli, la quale è di natura immunitaria, quindi ha generalmente carattere di specificità.

Per eseguirla, bisogna servirsi di uno strumento particolare, che è lo stalagmometro di Traube, il quale permette di contare con precisione il numero di gocce e frazioni di goccia date dall'unità di volume di vari liquidi o miscugli di liquidi.

Mentre l'unità di volume della mescolanza di un antigene col rispettivo siero specifico dà, appena fatta, un certo numero di gocce, dopo essere rimasta due ore a 37° C., essa dà invece un numero di gocce superiore.

Gli antigeni si preparano con metodi vari, secondo la qualità dei germi. Per il B. del tifo ed altri batteri simili si ricorre al metodo di Neisser e Shiga, (v. p. 1302) omettendo però il riscaldamento della sospensione batterica. Siccome le sostanze che partecipano alla reazione sono dei lipoidi, così può ottenersi un buon antigene nel seguente modo. Si prendono 5 cmc. di estratto acquoso di corpi batterici e vi si aggiungono 4 cmc. di alcool assoluto: il precipitato si riprende con altri 10 cmc. di alcool, poi si centrifuga e si decanta. Si mescolano le frazioni dell'alcool che devono essere limpide e si riducono al volume di 5 cmc., a 60° C., in bagnomaria (M. Ascoli).

Per il B. della tubercolosi l'antigene può essere preparato, secondo Izar, così. Delle pellicole di brodocolture o delle patine di agarcolture di B. della tubercolosi vengono triturate in mortaio, e poste a digerire in alcool a 96%, spesso rinnovato, a 37° C., per più giorni, fino a che l'alcool non rimane limpido. Il residuo bacillare vien disseccato in bagnomaria a 47° ed estratto con etere caldo, poi riessiccato e ripreso con etere, poi ancora una volta riessiccato ed estratto con alcool più volte fino ad esaurimento. Gli estratti alcoolici, riuniti e filtrati, vengono disseccati a 47°; al residuo si aggiungono gli estratti eterei, e si riessicca a 30°. Il nuovo residuo ottenuto si scioglie in alcool assoluto, poi si filtra, ed il liquido limpido si concentra fino a che non si veda qualcosa che si separi: allora si filtra di nuovo, più volte. All'estratto così ottenuto si aggiunge dell'etere a gocce fino a che non si forma un precipitato: si filtra allora, poi si scaccia l'etere, e queste operazioni di precipitazione, filtrazione e scacciamento dell'etere si ripetono fino a che nessun precipitato più si produca. L'estratto finalmente si essicca per l'ultima volta, si ridiscioglie in alcool e si concentra fino a saturazione.

La preparazione degli antigeni per la reazione meiostagminica è quindi abbastanza delicata, come appare dagli esempi riferiti, e può variare da germe a germe. Si aggiunga che gli antigeni sono anche labili, non si conservano lungo tempo, e talora perdono la loro attività per manovre inopportune, in apparenza insignificanti.

La reazione meiostagminica è stata ricercata anche in malattie non batteriche: così nell'anchilostomiasi, nell'echinococcosi, nei tumori maligni. Per questi tre casi furono usati come antigeni gli estratti alcoolici dei corpi di

anchilostoma, del liquido e della membrana di cisti d'echinococco, dei tessuti neoplastici maligni (cancri e sarcomi).

Per eseguire la reazione bisogna adoperare l'antigene fortemente diluito in soluzione di *NaCl* al 0.85 %. Da un lavoro dell'Ascoli togliamo uno schema tecnico che si riferisce al B. del tifo:

9 cmc. di una diluzione di siero di tifoso 1 : 10 + 1 cmc. estratto di bacilli tifosi 1 : 1000;

9 cmc. di una diluzione di siero di tifoso 1 : 10 + 1 cmc. estratto di bacilli tifosi 1 : 10,000;

9 cmc. di una diluzione di siero di tifoso 1 : 10 + 1 cmc. estratto di bacilli tifosi 1 : 100,000;

9 cmc. di una diluzione di siero di tifoso 1 : 10 + 1 cmc. estratto di bacilli tifosi 1 : 1,000,000.

Controllo: 9 cmc. di una diluzione di siero di tifoso 1 : 10 + 1 cmc. di soluzione di *NaCl* 0.85 %.

Si prendono i dati stalagmometrici di tutte le miscele, appena fatte; indi queste si pongono a 37° C., e vi si lasciano per due ore, trascorse le quali, si riprendono i dati stalagmometrici.

La reazione si dichiara positiva allorchè il numero delle gocce risultanti dalla seconda prova per una o per tutte le miscele è di almeno 2-3 superiore a quello ottenuto nella prima prova. Del resto gli scarti, come Ascoli chiama tali differenze fra i due numeri, possono essere anche di 4-6-8 gocce, secondo i vari casi che si dànno per le diverse infezioni o malattie in genere.

H. — TECNICA DELL'ESAME BATTERIOLOGICO DELL'ACQUA, DELL'ARIA, DEL TERRENO.

Oltre che l'esame batteriologico dell'acqua, dell'aria e del terreno, è necessario farne anche l'esame microscopico; di questo però si è già parlato nella Microscopia (v. pp. 929-952).

I. — ESAME BATTERIOLOGICO DELL'ACQUA.

Serve a ricercare il numero complessivo dei batteri contenuti in un centimetro cubico di acqua, il numero e la qualità delle specie, la presenza eventuale di batteri patogeni.

Si compie in quattro tempi successivi: prelevamento dei campioni, trasporto dei campioni, allestimento delle colture, osservazione delle colture con isolamento e diagnosi delle specie.

Prelevamento dei campioni.

Si adoperano apparecchi diversi secondo che l'acqua da prendere è direttamente accessibile alla mano dell'operatore oppure trovasi ad una certa profondità.

Gli oggetti da portar seco nel luogo dove si hanno da prelevare i campioni d'acqua sono, oltre i recipienti di raccolta, un termometro, delle pinze, una lampada a spirito, dei bicchieri a calice, dell'alcool, un taccuino e il necessario da scrivere, dei cartellini, dello spago, una forbice, un coltello, una lima e del ghiaccio in grossi pezzi.

Bisogna, prima di ogni altra operazione, liberare, quando occorre, da ogni minimo ingombro il getto o lo specchio d'acqua, da cui si vogliono prelevare i campioni.

Di ciascun'acqua da esaminare si prende la temperatura.

Si può prelevar l'acqua da una polla, da un ruscello, da una bocchetta di efflusso, dalla superficie di un serbatoio, di un lago, ecc. In tutti questi casi i campioni si raccolgono in *boccette di vetro* a collo largo e tappo smerigliato (v. fig. 481) o in tubi speciali detti *provette Tursini*, le quali contengono poca aria rarefatta ed hanno una lunga parte affilata, ripiegata su sè stessa (*b*) e chiusa alla lampada (v. fig. 474).

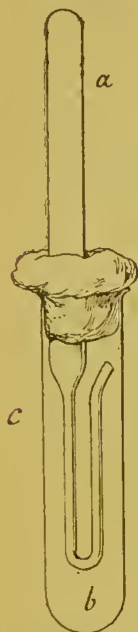


Fig. 474. Provetta Tursini.

Così le boccette come le provette vanno sterilizzate. Le prime debbono avere il tappo coperto da un quadratino di pergamena artificiale, ripiegato intorno al collo e ben legato, e devono essere involte in carta bibula prima di essere sterilizzate. Ogni provetta Tursini (v. fig. 474) va introdotta, con tutta la parte affilata e porzione del grosso *a*, in una più ampia provetta *c*, alla cui bocca resta fermata per mezzo di un batuffolo di ovatta, che, avvolgendo la prima, fa da tappo alla seconda. La rarefazione dell'aria si ottiene o riscaldando fortemente sulla fiamma il corpo della provetta, e poi, mentre questa è ancora sulla fiamma, saldando l'estremità affilata; oppure facendovi bollire poca acqua, e chiudendo l'estremità affilata quando la provetta è piena di vapore; questo poi precipita a temperatura ordinaria, lasciando il vuoto.

Per raccoglier l'acqua in una boccetta, si toglie questa dall'involucro di carta bibula, si leva la copertura di carta pergamenacea, e dopo essersi assicurati che il tappo gira bene dentro il collo, la si apre, e si raccoglie tant'acqua che non riempia del tutto la boccetta; poi si passa rapidamente alla fiamma l'orlo della boccetta e il tappo, e si chiude; si rilega la carta pergamenacea intorno al collo, si applica un cartellino indicante la data, il luogo, il nome dell'acqua, la temperatura, e si rinvolge nella carta bibula.

Questo mezzo di raccolta si presta per le acque che sgorgano dalle rocce in getto libero e per quelle che scorrono da bocchetta. Dovendo prelevare dell'acqua da uno specchio fermo o quasi, oppure da un serbatoio, da un lago, da un ruscello e simili, bisogna affondare alquanto la boccetta, ancor chiusa col suo tappo, orizzontalmente, sotto lo specchio liquido, e, nel caso di acqua corrente, in direzione opposta al corso, poi togliere il tappo, inclinando il recipiente in alto per dare la sfuggita all'aria, e finalmente richiudere, sempre sott'acqua. Estratta la boccetta, bisogna asciugarla avanti di procedere alle altre operazioni.

Ora è bene avvertire che, volendo prelevare i campioni col metodo testè descritto, occorre metter le mani nell'acqua, pratica non molto corretta,

quantunque le mani possano esser prima assai ben lavate, sia pure sterilizzate e deterse con alcool.

A tale inconveniente si ovvia con le provette Tursini.

Si estrae una provetta dal suo tubo protettore, si immerge nell'acqua per un certo tratto l'ansa della parte affilata, si afferra con una pinza metallica l'estremità libera di questa, e si dà un tratto di lato, come per allontanarla dal corpo della provetta; allora l'ansa sott'acqua si spezza, e per la rarefazione dell'aria esistente nel tubo l'acqua vi entra di botto. L'estremità rotta si chiude alla fiamma, si applica un cartellino con le solite indicazioni sul corpo della provetta, e questa si rinchiude nel suo tubo protettore.

Le provette Tursini servono anche a prelevare l'acqua fluente in getto libero. In tal caso l'acqua si raccoglie in un bicchiere a calice, sterilizzato poco prima sul luogo, col farvi ardere dentro un po' di alcool; l'ansa della provetta si tuffa nell'acqua raccolta dentro il bicchiere, e si rompe; indi si richiude nel modo già detto.

In alcuni casi però, come quando si debbono prelevare campioni da serbatoi profondi, cui non si può accedere, da pozzi, ovvero da strati relativamente profondi di grandi raccolte d'acqua, bisogna ricorrere ad apparecchi speciali, di cui si hanno modelli svariatissimi.

Ricordiamone i principali, e cominciamo dall'*apparecchio di Sclavo*. Esso è formato da una provetta, provvista di una lieve strozzatura nella parte inferiore, e dall'altro capo affilata; questo tratto affilato è piegato prima ad angolo retto, poi ad ansa, ed è chiuso alla lampada: nel tubo vi è aria rarefatta. Nella strozzatura inferiore è adattato un cerchietto metallico, fornito di due occhielli opposti in diametro; ad uno di essi, che trovasi dalla parte verso cui l'ansa apre la sua concavità, è legata una cordicella, che poi passa nell'ansa stessa; all'altro si aggancia un uncino cui è fissato un grosso cono di piombo. L'apparecchio dev'essere naturalmente tutto sterilizzato, compresa la cordicella: ciò si ottiene proteggendolo d'un involucro prima della sterilizzazione. Sul luogo del prelevamento si libera l'apparecchio dal suo involucro, e si cala, badando che l'ansa poggi premendo sulla cordicella: quando l'apparecchio è giunto alla profondità voluta, si infila il capo della cordicella in una palla di piombo forata, la quale, scivolando giù, viene a rompere l'ansa per modo che il tubo inclinandosi in basso si riempie quasi tutto d'acqua. Ritirato l'apparecchio, l'estremità rotta si salda alla fiamma: il resto si fa come è stato detto poco prima per la pipetta Tursini.



Fig. 475. Apparecchio Mazza.

L'*apparecchio di Mazza* (v. fig. 475) è una grossa provetta bruscamente e brevemente affilata ad uncino, chiuso alla lampada: anch'esso contiene aria rarefatta. La provetta è fissata, coll'uncino in basso, ad un bastone metallico, mediante due anelli; un filo metallico accavalca l'uncino, una molla a saltaleone è fissata al bastone di sostegno; e filo e molla unitamente sono fissati alla base di un cono di piombo capovolto. Una cordicella legata al sostegno permette di calare l'apparecchio; alla profondità voluta, si dà uno strappo violento alla corda, per modo che il saltaleone, distendendosi, provochi la rottura dell'uncino di vetro, quindi l'entrata dell'acqua nel tubo.

Per ottenere campioni d'acqua da strati molto profondi di una grande raccolta, sono stati usati vari apparecchi, nei quali i recipienti sono pure costruiti secondo il principio dell'aria rarefatta.

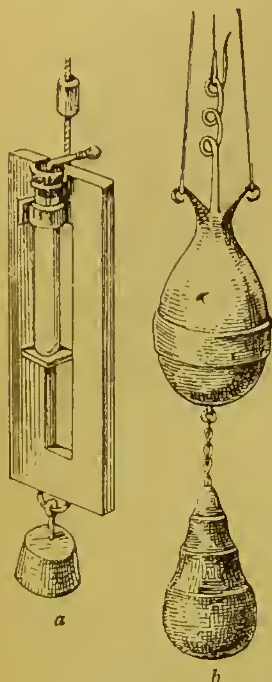


Fig 476.
a Apparecchio Russel.
b Apparecchio Miquel.

Uno di essi è l'*apparecchio di Miquel* (v. fig. 476 *b*). È un pallone di vetro col collo affilato, avvolto a spirale, e chiuso alla lampada; è rinchiuso in un astuccio metallico rotondo, con in basso un anello per fissarvi una pesante zavorra, ed in alto due appendici divergenti e terminanti ad occhiello. Per questi occhielli è affidato l'apparecchio a due cordicelle, mentre una terza cordicella centrale è legata all'ultima spira della parte affilata del palloncino. L'apparecchio si cala, ed al momento opportuno si rompe la parte affilata del pallone, tirando a strappi la cordicella di mezzo.

L'*apparecchio di Fabbri* (v. fig. 477) è così fatto. Il tubo di raccolta ha la parte affilata piegata ad angolo retto, è capovolto dentro una guaina metallica, e poggia sopra una mensoletta in modo che la punta chiusa ne sporga. La guaina e la mensoletta sono fermate ad un sostegno di metallo, inferiormente piegato a squadra. Il braccio orizzontale della squadra porta inferiormente saldato un grosso peso cilindro-conico, coll'apice in giù, mentre alla base è legata una cordellina. L'apparecchio si affonda quanto si crede, poi un grosso peso cilindrico forato si fa scivolare lungo la corda: il beccuccio percosso si rompe, e l'acqua entra nella provetta.

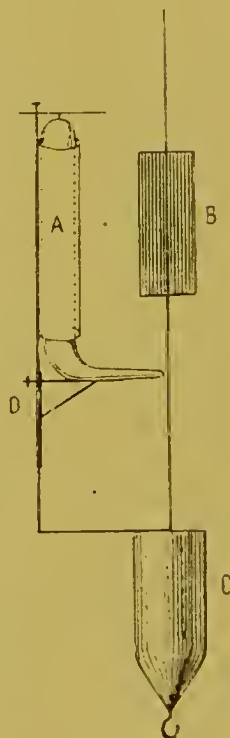


Fig. 477.
Apparecchio Fabbri.

L'*apparecchio di Russel* (v. fig. 476 *a*) è fatto di una semplice provetta, la quale è chiusa da un tappo di gomma forato e attraversato da un tubo a squadra, chiuso esternamente alla lampada. La provetta si ferma con adatti collari e mensolette ad un robusto telaio metallico, in modo che il tubetto chiuso alla lampada poggi sul regolo superiore di esso telaio. Al regolo inferiore di questo può agganciarsi, occorrendo, un grosso peso. Il telaio è affidato ad una cordellina, che tocca il tubetto affilato orizzontale. Alla profondità voluta, questo si rompe, mandando giù, sulla guida della cordellina, un pesante cilindro metallico forato.

Tutti i recipienti di cui fin qui si è discorso, e molti altri consimili, devono essere chiusi alla lampada appena fuori dell'acqua, come già si è detto. In laboratorio poi bisogna di nuovo romperli, per toglierne l'acqua da esaminare.

Ma sono stati immaginati altri apparecchi, nei quali non c'è bisogno di fare alcuna rottura.

Per i campioni d'acqua da prelevare a lievi profondità serve l'*apparecchio di Casagrandi* (v. fig. 478 e 479), il quale è così costruito. Il vaso di raccolta è una bottiglia di vetro cilindrica *A*, con una strozzatura *a* nel

collo, e dentro una pallina di vetro cava *b*, che ha un diametro maggiore di quello della strozzatura. La bottiglia è chiusa da un tappo di gomma biforato e attraversato da due tubi *c*, *e*, leggermente incurvati nel tratto esterno in modo che restino abbastanza lontani fra loro: in uno di essi *c* introducesi un lungo tappo d'ovatta grassa legato ad un filo *E*; all'altro *d* si attacca un breve tubo di gomma *f*, che porta all'altro capo un tubetto di vetro *g*, contenente un batuffolo di ovatta. Le parti descritte si sterilizzano al calore, prima separatamente, cioè la bottiglia a secco e il resto a vapore fluente; poi si ricompongono, e il tutto si risterilizza a vapore fluente.

Allorchè si deve prelevare il campione d'acqua, la boccetta s'introduce in un robusto cilindro metallico *B*, ben zavorrato, che al fondo possiede un disco, mobile dall'alto al basso e fornito di una molla. All'orlo di questa cu-

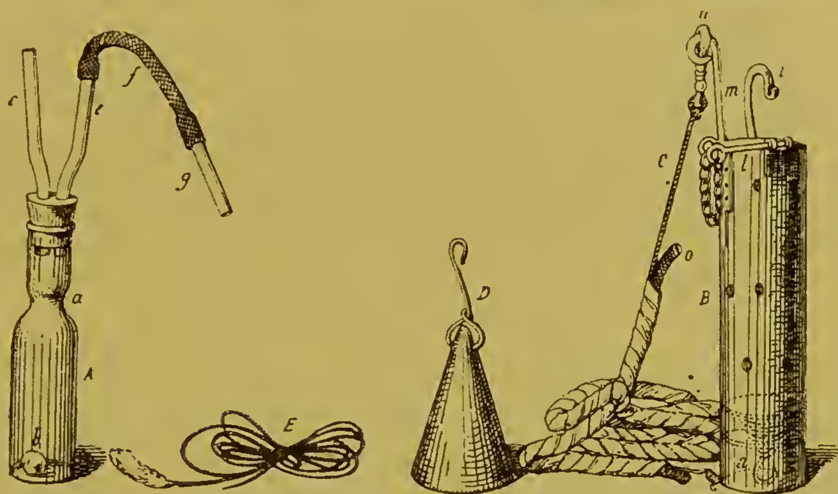


Fig. 478. — Apparecchio Casagrandi, scomposto.

stodia è connesso a cerniera un mezzo anello metallico *i*, che termina ad occhiello, così che, quando cade sul punto opposto, il suo occhiello viene ad incastrarsi fra due occhielli eguali che vi si trovano, e può essere fermato mediante una spinetta. Da questo mezzo anello viene accavalciato il tappo di gomma della bottiglia, la quale quindi resta premuta sul disco molleggiante che le sta sotto, in modo che non può muoversi nè essa nè il suo tappo.

Un bastoncino *m*, fissato al cilindro, ha l'estremità conformata ad occhiello; a questo si attacca per mezzo di un moschettone *n* la cordellina *C*, destinata a calare l'apparecchio. La cordellina *C* però non è libera che nell'ultimo tratto, poichè per la rimanente lunghezza trovasi addossata e fermata ad un robusto tubo di gomma *o*, per mezzo di un nastro avvolto ad elica. Prima di affondare l'apparecchio, il tubo di gomma *o* si congiunge col tubetto *g*, avendo prima estratto da questo il batuffolo d'ovatta che lo chiudeva; il filo *E*, cui è affidato il tappo d'ovatta del tubo *c*, dev'essere lungo quanto il tubo di gomma. La fig. 479 riproduce l'apparecchio già pronto.

Calato l'apparecchio alla voluta profondità, in modo però che il tubo di gomma resti sempre fuori dell'acqua, si tira il filo *E*, e l'acqua entra per il tubo *d*, mentre l'aria è scacciata per il tubo *c* attraverso quello di gomma. La pallina di vetro galleggia sempre, ed in ultimo, quando la bottiglia è

piena, batte contro la strozzatura, impedendo così che penetri altra acqua nel corpo della bottiglia. Però dell'acqua entra ancora nel collo e lo riempie.

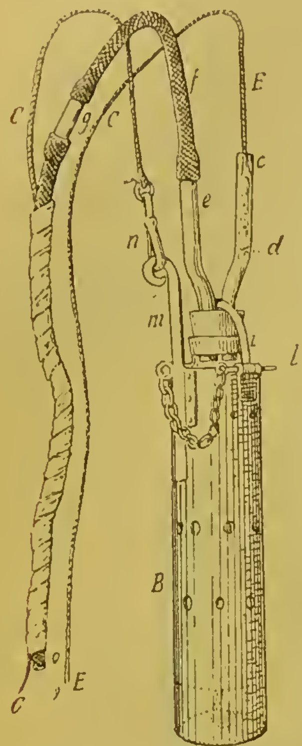


Fig. 479. — Apparecchio Casagrandi, pronto per l'affondamento.

Ritirato l'apparecchio, se ne estrae la bottiglia: da questa si leva il tappo con gli annessi; con una leggiera scossa si butta via l'acqua rimasta di sopra alla pallina; infine si rimette un nuovo tappo di gomma pieno, già sterilizzato e tenuto in pronto.

Col descritto apparecchio si possono prelevare dei campioni a 3-5 metri sotto il pelo dell'acqua Per maggiori profondità si può adoperare un *altro apparecchio di Casagrandi* (v. fig. 480).

Il vaso di raccolta è come quello del primo apparecchio, salvo che si chiude con un tappo di gomma attraversato da un solo tubo metallico *a*, la cui parete nel tratto superiore è obliquamente attraversata da un altro tubo metallico *b*, essendo naturalmente saldata la linea d'intersezione: questo tubo *b* sopravanza in alto il primo *a*, e dentro vi scende fin quasi a livello dell'orlo inferiore di esso. Il sostegno è di ottone, formato di quattro reggette equidistanti, parallele, fissate in basso a un disco ed in alto a un cupolino che presenta in *g* una larga mancanza per il passaggio dei due tubi metallici. Una delle quattro reggette, *b*, può essere rimossa per poter collocare nella gabbia il recipiente, il quale viene tenuto fermo mediante un disco verticalmente spostabile, fornito di una molla che spinge in alto. Ad una delle reggette sono fissati esternamente due regoli orizzontali *m*, *n*, aventi ciascuno un foro

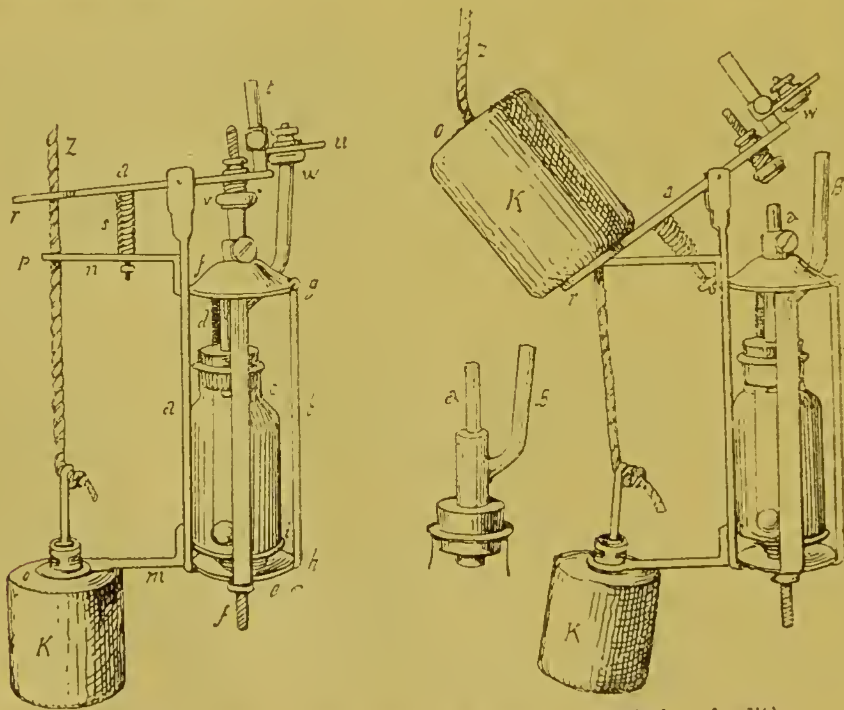


Fig. 480. — Altro apparecchio Casagrandi, per maggiori profondità.

terminale *o*, *p*. Sull'estremità della reggetta *a*, che sopravanza tutte le altre, è imperniato un altro regolo quasi orizzontale, che può girare intorno al pernio ed è anch'esso fornito di un occhiello *r*: un saltaleone, interposto fra essa ed il sottostante regolo fisso *n*, impedisce il contatto fra i due.

Il regolo mobile si prolunga fin oltre il centro del cupolino, piegandosi in alto ad angolo retto, e portando sul braccio verticale un'asticciuola orizzontale, scorrevole dall'alto al basso e fissabile con una vite. Tanto il regolo mobile, in corrispondenza dell'orificio del tubo metallico diritto, quanto l'asticciuola, in corrispondenza dell'orificio del tubo laterale, recano inferiormente due spessi dischi di gomma che restano compressi contro gli orifici rispettivi per la spinta che il saltaleone dà sull'opposto braccio di leva.

Un pesantissimo cilindro di piombo è sottoposto al regolo inferiore *m*, mentre il bastoncino metallico cui esso è saldato passa per il foro *o*; la corda legata al bastoncino, che termina uncinato, attraversa i fori *p* ed *r*.

Si manda l'apparecchio alla profondità voluta, poi lungo la corda si lascia cadere un grosso cilindro metallico, il quale, battendo sopra uno dei regoli a leva, fa alzare il braccio opposto, quindi aprire i due tubi: l'acqua entra per il tubo centrale mentre l'aria esce per il laterale, e la pallina galleggiante monta fin contro la strozzatura. Ritirato l'apparecchio, se ne estrae la bottiglia, e si opera com'è stato detto a proposito del primo apparecchio.

Trasporto dei campioni.

Quando non si possono fare le colture sul luogo stesso del prelevamento, ed è il caso di gran lunga più frequente, i campioni vanno trasportati in laboratorio con la maggior prontezza possibile, e durante il viaggio devono essere mantenuti ad una temperatura oscillante intorno a 0°. Si usano a tal uopo speciali *cassette di trasporto*, dentro rivestite di zinco o ferro zincato e fuori protette di uno strato di sostanza coibente; sono costruite a doppia parete, in modo che nell'intercapedine si possa mettere del ghiaccio o altra sostanza o miscela refrigerante.

Ve n'è di vari tipi.

Vi sono cassette di trasporto che, oltre allo scompartimento per collocarvi i campioni, un altro ne hanno per riporvi gli oggetti ricordati in principio di questo capitolo, ed altri da poter fare colture *in situ*, come pipette graduate e sterilizzate, scatole Petri, provette, terreni di coltura, un piccolo bagnomaria.

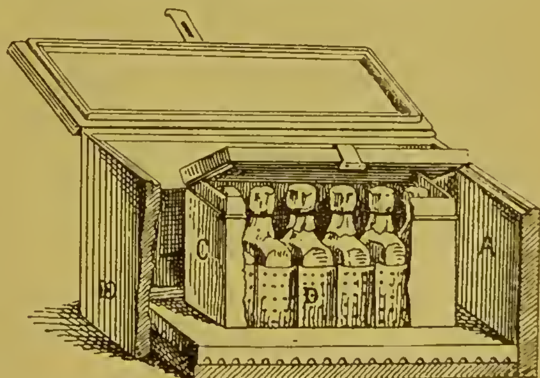


Fig. 481. — Cassetta di trasporto, di Abba.

Ma questa seconda suppelletile, come è stato detto, il più delle volte non serve; e la prima può essere messa in una cassettina a parte. Descriviamo perciò quei tipi di cassette che servono per il trasporto dei soli campioni.

La *cassetta di Abba* (v. fig. 481) ha pareti rettangolari di legno, internamente rivestite con lamine di zinco. Una lastra bucherellata rimovibile tro-

vasi a 2 cm. di altezza dal fondo, e sul mezzo di essa è posta una scatola di latta, pure con pareti rettangolari e munita di coperchio; in questa si collocano le boccette contenenti i campioni, le quali debbono avere pareti piane per potere essere bene accostate l'una all'altra: nello spazio fra la scatola di latta e le pareti della cassetta di legno si mette il ghiaccio in piccoli pezzi. L'acqua di fusione scola sotto la lastra bucherellata, e si può allontanare di tanto in tanto, aprendo una chiavetta innestata in una parete.

La *cassetta di Bertarelli* (v. fig. 482) ha forma cilindrica, e contiene una scatola di metallo bene stagnato, dentro la quale stanno gli scompartimenti cilindrici, perfettamente separati, nei quali si collocano i campioni. Fra la scatola metallica ed i sei scompartimenti, che insieme stanno nel mezzo, si pone la soluzione frigorifera. Per un foro esistente nel fondo della scatola, e che si può chiudere ermeticamente a vite, s'introducono gr. 1200-1300 di solfocianuro del commercio in cristallo o in polvere. Prima di mettervi i campioni, si versa da un foro collocato sul contorno superiore della scatola un litro d'acqua, e si agita. Si ha così un forte e durevole abbassamento della temperatura, la quale scende fin presso a zero. Il sale si può recuperare per evaporazione, però bisogna ricordare che è tossico.

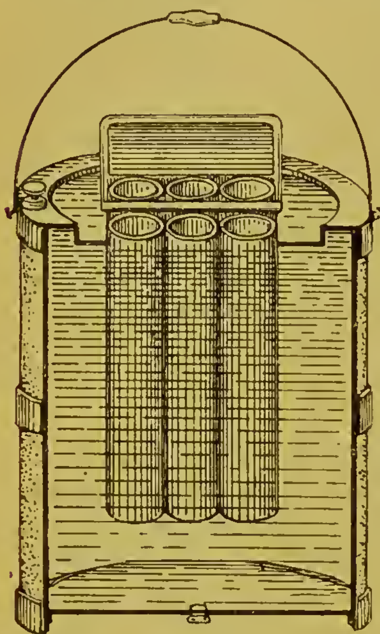


Fig. 482. — Cassetta di trasporto, di Bertarelli.

La *cassetta di Lautenschläger* è pure cilindrica ed è rivestita di linoleo. Nell'interno di essa trovasi un setto cilindrico di ferro zincato, sull'orlo del quale è fermato, mediante viti a pressione, un coperchio asportabile. Dentro allo spazio cilindrico trovasi un recipiente di uguale forma e materia, fornito di un coperchio simile. Due sostegni metallici vi stanno dentro, l'uno sull'altro: ciascuno è fatto di una base circolare e di due lamine semiellittiche, le quali sono verticalmente saldate ad essa e s'incrociano ad angolo retto. In ciascun quadrante sta una boccetta: sicchè in tutti e due i sostegni ce ne stanno otto. Fra il recipiente e la lamina circolare metallica si mette il ghiaccio; altro ghiaccio si pone sopra il piccolo coperchio. Poi si applica il coperchio più grande. Fra il setto circolare metallico e la parete della cassetta, che internamente è rivestita di zinco, si mette della segatura di legno.

Allestimento delle colture.

Le colture si devono allestire appena i campioni sono giunti in laboratorio: va notata la temperatura che essi hanno appena si tolgono dalla cassetta di trasporto. Prima di prelevarne la quantità occorrente per le colture, l'acqua dev'essere bene agitata, per ottenere una distribuzione uniforme dei germi.

Le colture si fanno a piatto per lo studio numerico e qualitativo della flora batterica; in agar e in gelatina ad alto strato o a piatto per la ricerca degli anaerobi; in terreni e con metodi speciali per la ricerca di alcune forme patogene.

Colture a piatto per lo studio della flora batterica.

Il terreno ordinariamente usato a tale scopo è la comune gelatina nutritiva; ma può essere utilmente usato anche l'agar, specialmente quando l'acqua esaminata contiene molti germi fluidificanti, che rendono ben presto inservibili ad ulteriori operazioni le piastre di gelatina.

L'agar che Hesse e Nieder hanno proposto per l'esame batteriologico dell'acqua è così fatto:

Agar	gr.	1.50
Albumosa di Heyden	»	0.70
Acqua distillata.	»	100.00

Si cuoce, si filtra per ovatta, si alcalinizza, si sterilizza.

La gelatina proposta da Abba è la seguente:

Brodo concentrato Liebig	gr.	6
Gelatina	»	150
Acqua distillata.	»	1000

Si cuoce, si filtra, si alcalinizza, si sterilizza.

La gelatina di Abba si rende alcalina in questo modo: tutta la massa si neutralizza prima con soluzione satura di carbonato sodico, adoperando come indicatore una soluzione alcoolica di fenolftaleina al 2 %; Raggiunto il punto neutro, si aggiunge per ogni litro mezzo grammo di carbonato sodico cristallizzato.

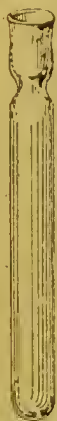
Altre formule di gelatine nutritive sono state consigliate ed usate da vari autori per l'esame dell'acqua, e si è tentato di introdurre una formula internazionale, per rendere possibile il confronto dei risultati dovunque si ottengano; ma questi lodevoli tentativi non essendo stati coronati ancora da buon successo, possiamo intanto servirci della gelatina ordinaria o di quella di Abba ed, occorrendo, anche dell'agar di Hesse e Nieder.

Qualunque terreno si scelga, si allestiscono in generale tre colture a piatto per ogni campione, l'una con 1 cmc. di acqua, l'altra con 0.5, la terza con 0.1; talora può essere necessaria una quarta coltura con 0.02. La semina può farsi in due modi: o si mette l'acqua nel terreno fluidificato e i tiepidito, mentre che è ancora nella provetta, e poi si agita e si versa nella scatola di Petri; oppure si pone l'acqua nel mezzo della scatola, e sopra vi si versa il sostrato nutritivo, agitandolo in vari sensi, ma senza violenza, in modo che si commisca bene l'acqua col sostrato, prima che questo si rifaccia solido.

Adottando la prima di queste due maniere, si pensi che un certo numero di germi restano con le poche gocce di sostrato nutritivo dentro la provetta; quindi bisogna arrotolare questa orizzontalmente sotto un getto d'acqua fredda per fare solidificare quel poco liquido in sottile strato: la provetta si pone in termostato, insieme con le piastre, e delle colonie che si

vedono poi nascere sulle pareti di essa va tenuto conto nella determinazione del numero totale dei batteri.

Le colture ottenute in questo modo si chiamano *colture arrotolate* secondo Esmarch, di cui prima si faceva uso molto più frequente: a tal uopo anzi erano adoperate delle provette con una leggera strozzatura sotto la bocca, dette tubi di Parietti, ed aventi una superficie totale di 100 cmq. (v. fig. 483).


Fig. 483. Tubo di Parietti.

Operando nel secondo modo, che è certo il più spedito, è meno facile ottenere una distribuzione uniforme dei germi; tuttavia con un po' di destrezza si riesce ad eliminare tale inconveniente. Per fare colture a piatto in gelatina, si prescelga questo procedimento; all'altro si ricorra, se si vuole, allorchè si devono allestire colture in agar.

Per la tecnica generale delle colture a piatto v. pag. 1262.

Le scatole seminate vanno messe in termostato a 22°, lo sviluppo dei germi va seguito giorno per giorno. Quanto più si prolunga l'osservazione, tanto più precisi risultati si ottengono, sia per ciò che riguarda il numero complessivo delle colonie, sia per il numero delle specie.

In tal proposito l'Abba ha per alcuni campioni d'acqua riconosciuto che lo sviluppo di tutti i germi era compiuto solo nel 14° giorno dopo la semina. Secondo i dati di Abba e di De Rossi possiamo dire che, in generale.

dopo	3	giorni	di incubazione	sono visibili	24-30 %	delle colonie
»	5	»	»	»	47-52 %	»
»	8	»	»	»	70-79 %	»
»	10	»	»	»	80-91 %	»

Secondo Hesse e Nieder, usando il loro agar speciale, dopo 5 giorni è già nato il 60 % delle colonie, dopo 7 giorni l' 80 %, dopo 10 giorni il 90 %.

Tuttavia non d'ogni acqua che si esamina nè d'ogni coltura che si prepara si riesce a prolungare l'osservazione per due settimane; in parecchi casi bisogna far punto fra il quinto e l'ottavo giorno. E per giungervi non bisogna trascurare le seguenti precauzioni.

Appena si vedono colonie fluidificanti, che tendono ad allargare il loro cerchio di fusione, si aspira la gelatina liquefatta con una pipetta capillare sterilizzata, e nell'incavo che rimane si pone una goccia di soluzione di sublimato 1 ‰. Se vi sono molte colonie di ifomiceti, che con i loro miceli si spandono troppo, minacciando di sopraffare le colonie batteriche, se ne impedisce l'invasione, ricoprendole interamente con del collodio elastico. Naturalmente si prende nota, per il computo definitivo, delle colonie dei fluidificanti e degl'ifomiceti, il cui accrescimento resta per i nostri artifizi interrotto. Alcune volte conviene, prima di attuare i detti espedienti, trapiantare in tubi le colonie, per diagnosticarne la specie.

La numerazione delle colonie, e la pesca di esse per farne colture pure e diagnosticare le specie, va fatta il giorno in cui si crede di non poter più oltre conservare le colture a piatto. Nel contare le colonie, il che si fa ad occhio nudo o con l'aiuto d'una lente a mano (v. p. 1278), si tiene conto delle colonie cromogene ed acromogene, delle fluidificanti e non fluidificanti; si notano a parte le colonie di attinomiceti, blastomiceti, ifomiceti.

Per contare le colonie nelle colture arrotolate, si adopera il contacolonie di Esmarch (v. fig. 484), che è costituito da una doccia metallica, nella quale si può incastrare un tubo di Parietti e che porta tre finestrine quadre, della superficie di 1, $^1/_4$, $^1/_9$ cmq. La doccia è affidata ad un sostegno, e sopra ad essa può maneggiarsi una piccola lente d'ingrandimento.

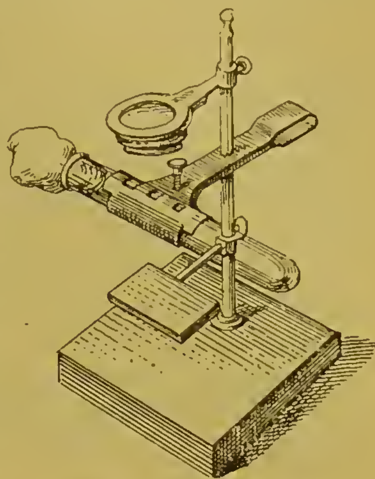


Fig. 484. — Contacolonie di Esmarch.

Per la pesca bisogna prima notare di quanti aspetti differenti sono le colonie; si formano così più gruppi di colonie, ragionevolmente presumendo che appartengano ad una medesima specie le colonie di apparenza uguale o similissima. La pesca si fa secondo le norme indicate a pag. 1263; la semina si fa per infissione in gelatina. I tubi seminati si tengono a 22°, e quando le colture sono bene sviluppate, si notano i loro caratteri, e se ne fanno dei passaggi in altri sostrati nutritivi, specialmente su agar, su patata, in brodo: raccogliendo in ultimo i caratteri colturali, confrontandoli coi caratteri microscopici, se occorre anche coi risultati di speciali indagini e di esperimenti negli animali, si ha quanto è richiesto per determinare le specie, avvalendosi degli elenchi sistematici di Lustig, di Ehrenberg, di Migula, di Matzushita.

Ricerca degli anaerobi.

Da alcuni autori si dà non poca importanza alla presenza di anaerobi, anche non patogeni, nell'acqua, o meglio al rapporto numerico fra i batteri anaerobi e gli aerobi. Vincent chiama indice anaerobico tale rapporto, che è nelle buone acque sempre di molto inferiore ad 1. Se l'indice cresce fino ad accostarsi o a diventare superiore ad 1, vuol dire che nell'acqua sono penetrate sostanze organiche in putrefazione.

Non ostante questa considerazione, l'importanza pratica della ricerca è negata o poco apprezzata da altri autori, principalmente per due ragioni: perchè la numerazione degli anaerobi è mal sicura, e perchè, se un'acqua è contaminata da sostanze organiche in putrefazione, già il numero complessivo dei batteri, riconoscibile con le semplici colture a piatto, risulterà grandissimo; come anche molte saranno le specie batteriche, ed alcune di esse tali che possono essere prese come indizio sicuro della presenza di materie putrescibili nell'acqua.

In ogni modo la ricerca degli anaerobi, se anche non può essere numericamente rigorosa, può sempre fornire un criterio di più per giudicare delle buone o cattive condizioni di un'acqua.

Le colture possono farsi per agitazione ad alto strato, o a piatto con l'uso della plastilina (v. p. 1269).

Ricerca di alcuni batteri patogeni.

Tutti i metodi usati per la ricerca di germi patogeni nelle acque hanno comune questo principio generale: si deve adoperare molta acqua, e sottoporla a tali operazioni che riescano a raccogliere tutti i batteri di essa in piccolissimo volume (metodi di evaporazione, di precipitazione); oppure trasformarla, con l'aggiunta di sostanze speciali, in un liquido nutritivo che favorisca la moltiplicazione dei germi che si ricercano, tenendo in freno gli altri, almeno per un certo numero di ore (metodi di arricchimento). Le colture d'isolamento si allestiscono, nel primo caso, col piccolo residuo che si ottiene; nel secondo, con una parte dell'acqua trasformata in liquido nutritivo.

I principali metodi del primo tipo, che possono dirsi *metodi di semplice separazione*, utili per la dimostrazione di qualsiasi germe, sono i seguenti:

Metodo della filtrazione.

Parecchi litri dell'acqua in esame si filtrano per candele porose, facendola passare dalla superficie esterna all'interna di esse; dopo si raschia il materiale batterico rimasto aderente alla faccia esterna delle candele, si sospende in poca soluzione fisiologica, e se ne fanno le colture d'isolamento in terreni opportunamente scelti, secondo che conviene al germe che si ricerca; oppure inoculando la sospensione direttamente, se credesi opportuno, in adatti animali di esperimento.

Siffatto espediente è stato usato per ricercare gli anaerobi patogeni, i *Bb. coli, typhi, dysenteriae* e simili, il *V. cholerae*.

Metodo dell'evaporazione.

Un litro d'acqua si evapora ad una temperatura che non superi 37° C., finchè non restino che pochi cmc. appena; da questi si fanno le colture.

Metodi di precipitazione.

Ve ne sono diversi: fra quelli che si possono usare per vari batteri patogeni, principalmmente per i batteri enterici, ricordiamo quelli di Ficker, di Müller, di Willson.

Metodo di Ficker. — Ad un litro dell'acqua in esame si aggiungono 4 cmc. di una soluzione sterile di carbonato sodico al 10 %, poi cmc. 3.5 di una soluzione sterile al 10 % di solfato ferrico. Si lascia sedimentare a bassa temperatura, poi si decanta, ed il liquido residuo, ben rimescolato, si centrifuga. Separato il sedimento, si scioglie in ugual volume di una soluzione neutra sterile al 25 % di tartrato potassico, e poi ancora si aggiunge della stessa a goccia a goccia fino a che si ottenga una perfetta soluzione, che serve per le colture.

I pochi cmc. del liquido ottenuto si seminano nei terreni di coltura più convenienti. Se si tratta di ricercare i batteri enterici, il liquido si distribuisce sopra un numero sufficiente di piastre di agar Drigalski-Conradi o di agar Endo (v. p. 1256). Le ulteriori operazioni da eseguire per la identificazione si ricerchino nella parte speciale.

Metodo di Müller. — A 3 litri dell'acqua da esaminare si aggiungono 5 cmc. di *Liquor ferri oxychlorati* (*Fe OCl*), il quale, per azione sui sali di calcio, dà prontamente un precipitato. Questo, senza bisogno che prima sia ridisciolto, si semina direttamente sui terreni speciali d'isolamento dei germi che si ricercano.

Metodo di Willson. — Ad un litro di acqua si aggiungono 5 cmc. di una soluzione al 10 % di solfato doppio di alluminio e potassio, che, agendo sui bicarbonati presenti nell'acqua da esaminare, dà un precipitato di idrato alluminico-potassico, di aspetto gelatinoso. Il precipitato si semina nei terreni opportuni, senza essere precedentemente ridisciolto.

Metodi di arricchimento.

I metodi del secondo tipo, o *metodi d'arricchimento*, sono per lo più differenti secondo la specie che si ricercano.

Metodo di Abba, per il *Bact. coli*. — In un pallone sterilizzato si versano 900 cmc. dell'acqua da esaminare, e la si trasforma in terreno di coltura aggiungendovi 100 cmc. di brodo lattofenolftaleinizzato concentrato (v. p. 1254). Oppure, se il brodo non è già stato reso alcalino, tale operazione può farsi dopo la mescolanza di esso con l'acqua. Perciò alla miscela si aggiunga 1 cmc. di soluzione alcoolica di fenolftaleina, e tanta soluzione satura di carbonato sodico finchè il liquido non prende una colorazione rosa bene netta. Si pone in termostato, ed appena si vede il liquido scolorato (il che, *esistendo il B. coli*, può accadere già dopo 8-12 ore) si fanno delle colture d'isolamento a piatto, e da queste poi, sviluppate che siano, si pescano le colonie sospette e si procede all'identificazione coi soliti criteri. Il Casagrandi ha visto che si possono isolare dal liquido scolorato anche altri germi, oltre il *Bact. coli*; il *M. liquefaciens*, il *Bact. vulgare*, ed un *Bact. viscosum*.

Metodo di Hoffmann e Ficker, per il *Bact. coli*. — Poichè il *Bact. coli* può nascere dall'acqua trasformata in liquido nutritivo d'arricchimento secondo la formula che questi autori escogitarono per il B. del tifo (vedi più oltre) il metodo è applicabile anche all'isolamento del *Bact. coli;* è bene in ogni modo escludere la caffeina. Dopo 12-13 ore che l'acqua, fatta sostrato nutritivo, è rimasta a 37°, se ne prendono successivamente, mediante pipette graduate sterilizzate, alcuni mezzi cmc. e si distribuiscono alla superficie di altrettante piastre di agar Drigalski-Conradi o di agar Endo (v. p. 1256).

Per i consecutivi procedimenti v. Parte speciale, *Bact. coli*.

Metodo Parietti, per il *B. typhi*. — In questo metodo si utilizza la proprietà che il B. del tifo ha di crescere abbastanza bene in reazione acida,

e a temperatura piuttosto alta, le quali due condizioni sono ostacolo, almeno entro un certo numero di ore, alla moltiplicazione di altri germi.

Si approntano tre soluzioni, in concentrazione diversa, di acido fenico ed acido cloridrico, in brodo ordinario, e precisamente:

1) Acido fenico 0.45 ‰ + acido cloridrico 0.40 ‰
2) » 0.95 ‰ + » 0.80 ‰
3) » 1.45 ‰ + » 1.15 ‰

In una serie di 10 provette si versano 10 cmc. del 1° brodo per ciascuna provetta; in una seconda serie di altre 10 similmente si versano 10 cmc. del 2° brodo; in una terza si fa altrettanto col 3° brodo. Ai 10 liquidi di ogni serie si aggiungono rispettivamente cmc. 0.1, 0.2, 0.3..... 1 dell'acqua in esame. I tubi vanno poi messi a 42-43° C., e tenuti a questa temperatura per uno o più giorni.

Dai liquidi che s' intorbidano si fanno colture a piatto, per isolare il B. del tifo da altri germi che eventualmente possono essere cresciuti insieme con esso.

Metodo Cambier, per il *B. tyhi.* — Non è un metodo d' arricchimento vero e proprio, come d'altra parte non è semplicemente un metodo di separazione: tuttavia si ricorda qui, perchè ai metodi d'arricchimento si accosta maggiormente nella questione di principio.

Un po' del materiale raschiato dalla superficie delle candele per cui si è filtrata l'acqua, s'introduce nell'interno di una candela Chamberland, che contiene del brodo Cambier (soluzione acquosa di peptone 5 % cmc. 1000 + soluzione di soda caustica 1 % cmc. 100 + soluzione satura a freddo di $NaCl$ cmc. 100) ed è immersa in un recipiente con 20 cmc. dello stesso brodo; dopo 24 ore il B. del tifo, se c'è, si ritrova nel liquido nutritivo esterno, prima che vi passino altri germi. Per la dimostrazione bisogna però sempre allestire dal brodo esterno le colture d'isolamento e poi quelle d'identificazione, servendosi dei moderni mezzi speciali di cultura.

Metodo di Hoffmann e Ficker, per i Bacilli tifoso e paratifosi. — Avendo un litro d'acqua da esaminare, bisogna aver pronti i seguenti liquidi:

1° una soluzione di 10 gr. di nutrosio in 80 cmc. di acqua distillata sterile, fatta bollire a bagnomaria per alcune ore;

2° una soluzione recente di 5 gr. di caffeina in 200 cmc. di acqua distillata sterile, la quale soluzione riesce facilmente a 80°;

3° una perfetta soluzione recente di gr. 0.1 di cristalvioletto B Höchst in 100 cmc. di acqua distillata sterile.

Il miscuglio si fa così:

La soluzione 1 si versa nella soluzione 2; la miscela così fatta si aggiunge a 900 cmc. dell'acqua in esame; in ultimo, agitando sempre, si aggiungono a poco a poco 10 cmc. della soluzione 3.

Il miscuglio così ottenuto può distribuirsi in matracci da 100 cmc.

Si tengono questi matracci a 37° per 12-13 ore; poi si procede alla semina in piastre Drigalski-Conradi ed all'isolamento delle colonie turchine, se nascono, quindi alla loro identificazione (v. Parte speciale, B. del tifo).

Il metodo di Hoffmann e Ficker sembra il migliore di quanti fino ad oggi se ne sono escogitati.

Metodo di Heim, per il *Vibrio cholerae asiaticae* ed altri vibrioni. — Un litro dell'acqua in esame si mescola con 100 cmc. di acqua peptonata concentrata (v. p. 1257), e si distribuisce in matracci da 100 cmc.; dopo 8-12 ore si fanno dei preparati microscopici dalla superficie del liquido; da quello o da quei matracci, il cui contenuto ha mostrato di contenere dei vibrioni, si allestiscono colture in provette di acqua peptonata, e colture a piatto in agar e in gelatina. Per i procedimenti ulteriori fino all'identificazione di specie, v. Parte speciale, V. del colera.

Enumerazione dei risultati dall'esame batteriologico dell'acqua.

I risultati dell'esame batteriologico dell'acqua forniscono, tutti insieme, un criterio prezioso da far pesare insieme con gli altri sul giudizio di potabilità. Ma di ciò qui non si discorre, essendo l'argomento riservato ad altra parte di questo Manuale (v. V. II, p. 377).

Solo, riassumendo, ricordiamo i dati che l'esame batteriologico deve fornire:

1° il numero totale dei germi contenuti in un cmc. di acqua;

2° il numero delle colonie fluidificanti rispetto alle non fluidificanti;

3° il numero delle colonie cromogene in rapporto alle acromogene;

4° il numero e la qualità delle specie batteriche;

5° il numero degli attinomiceti, blastomiceti, ifomiceti (dei quali, pur non essendo batteri propriamente detti, si tien conto, perchè sono come essi coltivabili);

6° eventualmente l'indicazione approssimativa del numero degli anaerobi;

7° l'esito delle ricerche speciali per la dimostrazione di batteri patogeni.

II. — ESAME BATTERIOLOGICO DELL'ARIA.

Per ricercare i germi coltivabili che si trovano nell'aria sono stati immaginati diversi metodi.

Metodo della deposizione.

Il Koch usò per primo questo metodo. Nel fondo di un bicchiere alto 18-20 cm. si colloca una capsula piana di vetro, contenente gelatina solidificata. Il recipiente si espone all'aria che si vuole esaminare, quando però non è mossa da forte vento, e si lascia stare per un certo numero di ore. Poi si estrae la capsula, si chiude col suo coperchio e si pone in termostato. Si tiene in osservazione quotidiana per parecchi giorni, poi si contano le colonie, se ne fanno le colture in provette e si procede all'identificazione.

È facile comprendere quanto sia imperfetto questo metodo.

Tuttavia, se si conviene di usare piastre sempre uguali, di tenerle esposte all'aria per ugual tempo e di contare le colonie dopo un determinato numero di giorni, è certo che dai vari esami possono ottenersi dati abbastanza paragonabili fra loro, quantunque affetti da errori.

Metodi di aspirazione.

Giovandosi dei risultati del metodo precedente, si può dire soltanto quanti germi si depongono da una data colonna d'aria nell'unità di tempo.

Preme invece assai più, perchè è cosa più precisa, conoscere quanti se ne trovano nell'unità di volume.

A tale intento si adoperano degli aspiratori, i quali facciano passare l'aria e il suo pulviscolo in recipienti speciali, contenenti sostanze capaci di trattenere i germi, e siano tali da far conoscere il volume dell'aria aspirata. Si può usare a tale scopo un aspiratore propriamente detto, o l'apparecchio di Petri.

Un buon aspiratore si può approntare semplicemente con due grandi boccioni di vetro di uguale capacità. Si chiudono tutti e due con un tappo di gomma, o anche di sughero compatto, la cui tenuta può essere assicurata con mastice o paraffina o altre simili sostanze: il tappo abbia due fori; nell'uno s'introduca un breve tubo di vetro o di metallo, nell'altro un lungo tubo che scenda fino al fondo del recipiente, e termini con taglio obliquo. Prima di chiudere uno dei due boccioni, vi si versa tanta acqua, che il suo specchio sorpassi di due dita circa l'apertura del tubo pescante sul fondo. Si segna sul boccione questo livello con inchiostro indelebile o altrimenti; poi si versa dell'altra acqua, in quantità misurata, per esempio 10-15 litri. Nell'altro boccione si versa anche dell'acqua, finchè il pelo di questa non sopravanzi l'estremità del tubo che sta nel fondo, e se ne segna il livello. Chiusi ermeticamente i boccioni col loro tappo, si congiunge, con robusto tubo di gomma, il tubo lungo del primo boccione col corto del secondo. Si colloca il boccione pieno circa 80 cm. più alto del vuoto, ed inclinando il boccione inferiore in modo che l'apertura del tubo al fondo venga fuori della poca acqua che c'è, si fa una forte aspirazione dal tubo corto allo scopo di promuovere il sifonaggio. L'acqua cade continuamente, aspirando l'aria, per il tubo corto, dal boccione più alto: appena in questo il livello dell'acqua è giunto al segno fatto in basso, si stringe il tubo di gomma con una pinza a pressione: sono così caduti 10 o 15 litri di acqua. Invertendo ora la posizione dei due boccioni, basta togliere o aprire la pinza perchè l'acqua ricada nel boccione precedentemente vuotato. Ad ogni inversione dunque si possono aspirare 10-15 litri di aria. Il recipiente destinato a raccogliere i germi va sempre congiunto col tubo corto del boccione superiore.

L'apparecchio o pompa di Petri (v. fig. 485) consta di una comune pompa aspirante e premente, il cui fondo è connesso ad un sostegno per mezzo d'un'articolazione a noce, ed il braccio dello stantuffo è congiunto eccentricamente con una ruota metallica.

Facendo girare questa ruota, per mezzo di una manovella, ad ogni giro di essa lo stantuffo compie una corsa intiera di va e vieni. La valvola che permette l'entrata dell'aria nel corpo di pompa si congiunge, per mezzo di un tubo di gomma, col recipiente destinato a trattenere i germi; la valvola per cui l'aria è ricacciata può essere messa in comunicazione con un ordinario contatore di gas.

Dico « può essere », perchè la capacità del corpo di pompa essendo nota, basterebbe contare quanti giri si fanno fare alla ruota per conoscere

il volume dell'aria aspirata; ma, dovendo manovrarc l'apparecchio per molto tempo, l'uso di un contatore è vantaggioso.

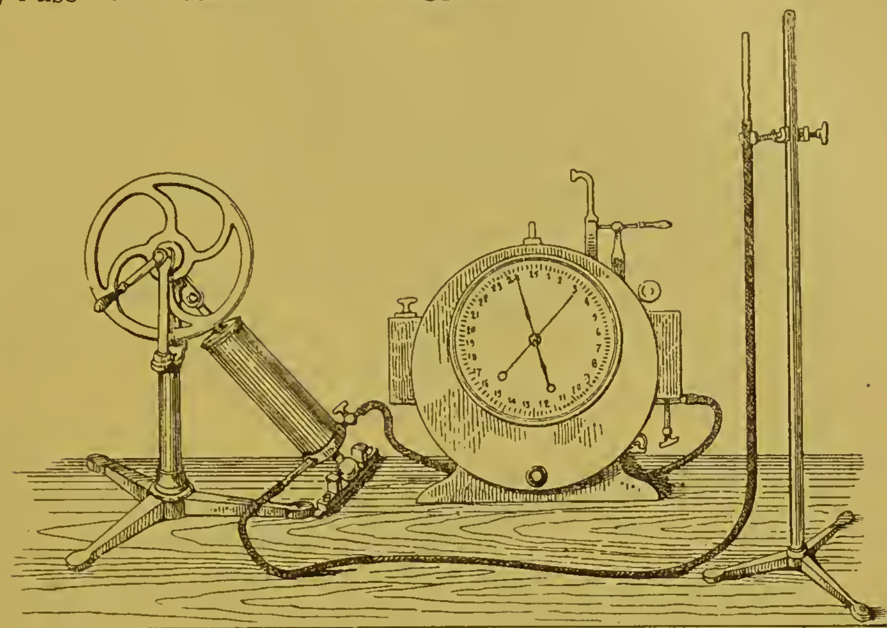


Fig. 485. — Pompa di Petri e contatore in funzione.

La quantità d'aria che si aspira in tutto è di solito di 30-50 litri, raramente di più.

Premessa questa notizia sui mezzi per aspirare l'aria, diciamo ora dei metodi, dei recipienti e delle sostanze che si adoperano per trattenere i germi.

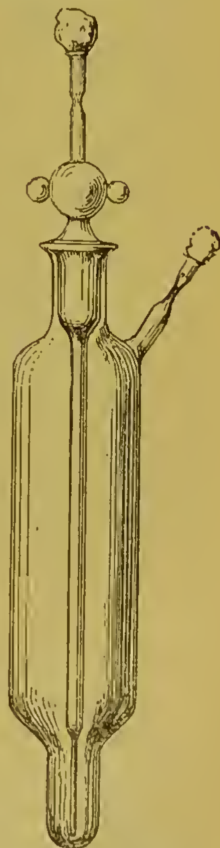


Fig. 486. — Tubo di Strauss e Wurtz.

Metodo di Strauss e Wurtz.

L'apparecchio di Strauss e Wurtz (v. fig. 486) è un grosso tubo cilindrico, ristretto inferiormente a cono e terminante a ditale. Presso il collo porta una tubulatura laterale, inclinata in alto e leggermente strozzata, chiusa da un tappo d'ovatta. Fino al fondo del tubo scende una lunga pipetta, che a conveniente altezza è ingrossata e smerigliata in guisa da poter chiudere perfettamente il collo del tubo: essa porta in alto una strozzatura ed è chiusa con un tappo d'ovatta. Nell'apparecchio, precedentemente sterilizzato nella stufa a secco, si versano, dopo aver levato la pipetta, 20 cmc. di gelatina sterile liquefatta: riposta la pipetta a posto, l'apparecchio si tiene per 10′ nella pentola di Koch.

Nel luogo della ricerca il tubo si mette in bagnomaria perchè la gelatina si liquefaccia, e vi si lascia poi, a temperatura di 25°, per tutta la durata dell'operazione. Si congiunge la tubulatura lateralc, liberata lì per lì dell'ovatta, con l'aspiratore: si toglie poi anche il tappo della pipetta, e

s'inizia l'aspirazione. Terminata la quale, si richiudono la pipetta e la tubulatura laterale coi loro tappi.

In laboratorio si fluidifica di nuovo la gelatina, che però non deve raggiungere una temperatura superiore a 30°, e se ne allestiscono 4 colture a piatto: 10 cmc. di gelatina sterile fluidificata si versano poi nel tubo rimasto vuoto, e girando questo orizzontalmente sotto un getto d'acqua fredda, se ne fa una coltura arrotolata.

La numerazione delle colonie e lo studio delle specie si fa come è stato detto per l'esame dell'acqua.

Il metodo di Strauss e Wurtz dà, quando l'operazione si prolunga molto, un numero di colonie maggiore del vero, poichè nella gelatina mantenuta a 25° i germi, via via che ci capitano, cominciano a moltiplicarsi.

Metodo Sanfelice.

Si usano tre o quattro grosse provette (v. fig. 487) contenenti una soluzione di glicerina al 5 %, e chiuse da tappi biforati, attraversati da un tubo corto e da uno lungo, che è conformato a pipetta e pesca nel liquido. Le provette fanno tutto un sistema, perchè dei tubi di gomma congiungono il tubo corto di ciascuna provetta col tubo lungo della successiva. Le provette vanno, ben inteso, sterilizzate, essendo il braccio orizzontale di ciascun tubo protetto da un batuffolo d'ovatta, che si toglie sul luogo della ricerca.

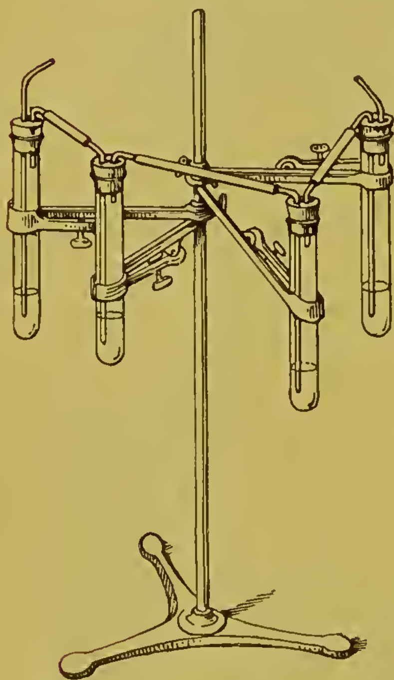


Fig. 487. — Apparecchio Sanfelice.

L'aspiratore si congiunge col tubo breve dell'ultima provetta, mentre l'aria entra per il tubo a pipetta della prima. L'aria gorgoglia successivamente nelle tre o quattro provette, sicchè all'uscita dell'ultima essa ha deposto nell'acqua glicerinata i germi che conteneva.

In laboratorio si prelevano quantità misurate dei liquidi di ciascuna provetta, e se ne fanno delle piastre. Sviluppate le colture, e numerate le colonie, si computa in modo facile a immaginare il numero dei germi contenuti nel volume d'aria fatto passare attraverso la soluzione di glicerina.

Metodo Petri.

L'aria si fa passare attraverso un tubo cilindrico di vetro, lungo cm. 10 e largo cm. 1.5 (v. fig. 488 *a*). Il tubo si prepara in questo modo: fino al mezzo di esso si spingono, una da ciascuna apertura, due rotelle di tela metallica, in modo che vi stiano addossate e ben ferme. Si riempie una metà del cilindro con sabbia costituita di granuli del diametro di mezzo millimetro, si applica un'altra rotella di tela metallica e si chiude l'apertura con tappo d'ovatta; altrettanto si fa per l'altra metà, la quale in ultimo si chiude con

tappo di gomma, attraversato da un tubetto di vetro. Prima di mettere in azione l'aspiratore, che si congiunge col tubetto di vetro, si toglie il tappo d'ovatta dal capo libero di questo. Finita l'operazione, e portato il tubo in laboratorio, la sabbia si sparge dentro scatole di Petri, e sopra vi si versa della gelatina.

Questo metodo dà risultati poco attendibili, poichè molti germi i quali hanno aderito ad uno stesso granulo possono crescere in colonie confluenti, la cui numerazione quindi riesce difficile o incerta; ed anche perchè la presenza dei granuli di sabbia nel sostrato nutritivo disturba l'osservazione.

Metodo Miquel.

Si adopera un tubo cilindrico di vetro (v. fig. 488 *b*), lungo 25 cm. e largo mezzo cm., leggermente strozzato presso uno dei capi e terminante a cono

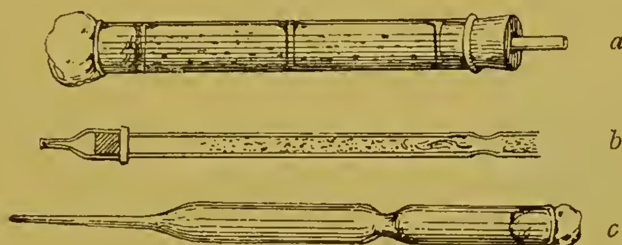


Fig. 488. — *a*, tubo di Petri; *b*, tubo di Miquel; *c*, tubo di Pasteur.

smerigliato dall'altro capo. Contro la strozzatura si adatta un batuffolo d'ovatta; l'altro capo è chiuso da un cappuccetto di vetro, che ha superficie interna smerigliata, ed è aperto anche nella parte terminale; l'apertura terminale è chiusa da un batuffolo d'ovatta. Del solfato di sodio o, meglio, dello zucchero di canna polverizzato e secco, s'introduce nel tubo, il quale poi si chiude col cappuccetto di vetro. Così montato, il tubo si sterilizza a secco, facendo salire la temperatura non oltre 150°, lentamente, per impedire che lo zucchero si caramelli. Al momento di servirsene, il capo che porta la strozzatura si congiunge con l'aspiratore, si toglie dall'opposto capo il cappuccetto di vetro, e si fa passare l'aria. Compiuta l'operazione, si ripone il cappuccetto.

In laboratorio il sale o lo zucchero si fa cadere in una determinata quantità d'acqua sterilizzata; e per riprendere quel po' di sostanza che rimane attaccata alla parete, si lava il tubo, aspirandovi e rigettandone più volte un po' dell'acqua medesima.

Della soluzione così ottenuta si fa l'esame batteriologico non altrimenti che d'un campione d'acqua.

In vece del tubo di Miquel, può anche adoperarsi per lo stesso scopo una specie di pipetta strozzata, quale si vede nella fig. 488 *c*.

Metodo Ficker.

Si usa un tubo di vetro cilindrico, lungo 10 cm. e largo 2 cm., che presso una delle sue aperture è dilatato in ampolla (v. fig. 489). Dentro di esso sporge una fascetta circolare di vetro, in forma di tronco di cono, con la base

maggiore inserita al cerchio limitante l'ampolla verso la parte destra del tubo, e la base minore aperta nello spazio dell'ampolla medesima. Questo espediente ha lo scopo di impedire che i germi trascinati dalla aspirazione vadano a deporsi contro la parete del tubo.

Si introduce un disco di fine rete metallica dall'apertura del pezzo corto del tubo, spingendolo fin verso l'inserzione della fascetta testè descritta, poi dall'apertura opposta si versano dei granuli di vetro pesto di mm. 0.5 e 0.25, mescolati nel rapporto di 3:1, e si scuotono e si calcano in modo

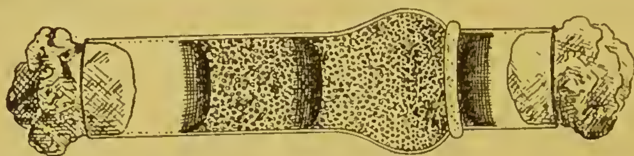


Fig. 489. — Tubo di Ficker.

che tutti insieme occupino il minor volume; a mezzo tubo s'interpone altra rete metallica, poi di nuovo altri granuli di vetro ed altra rete. Due tappi d'ovatta chiudono il tubo d'ambo i capi. La sterilizzazione si fa nella stufa a secco, a 160°, per due ore. Nel momento di servirsene, al batuffolo di ovatta che protegge l'apertura della parte lunga del cilindro, si sostituisce un tappo di gomma attraversato da un tubo di vetro.

Gli ultimi procedimenti nel metodo Ficker sono del resto in tutto simili a quelli detti per il metodo Petri.

Metodo Casagrandi.

Il Casagrandi ha cercato di riunire i vantaggi dei migliori fra i metodi predetti. In una fiaschetta di Roszahegyi (v. fig. 490), che è una boccetta molto schiacciata, e sopra una faccia porta una quadrettatura in centimetri, si versano 10 cmc. di glicerina al 5 %: si tappa e si sterilizza a vapore.

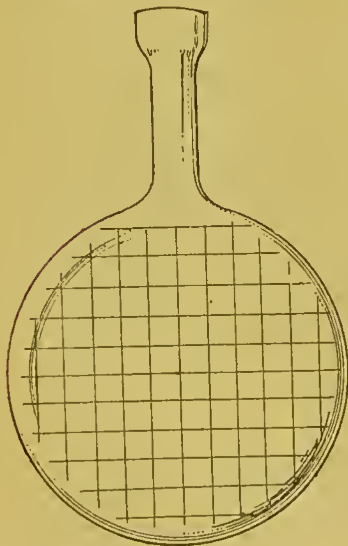


Fig. 490. — Fiaschetta di Roszahegyi.

D'altra parte si prepara un tappo di gomma biforato, adattabile al collo della fiaschetta, e attraversato da due tubi a gomito; uno di essi ha il braccio verticale corto, che termina poco sotto il tappo, e l'orizzontale provvisto di una bolla contenente dell'ovatta; l'altro ha il braccio verticale lungo, terminante a pipetta, e l'orizzontale introdotto in un tappo di gomma forato. L'insieme, in carta bibula, si sterilizza a vapore.

A parte ancora si sterilizza, con le precauzioni indicate discorrendo del metodo Miquel, un tubo cilindrico contenente 3 gr. di zucchero di canna in granuli di 0.5-1 mm., e contro di essi, dall'uno dei capi, un dischetto della stessa sostanza: le due aperture sono tappate con ovatta.

Sul luogo della ricerca, al tappo d'ovatta nella fiaschetta Roszahegyi si sostituisce il tappo di gomma biforato; al tappo di gomma infilato nel

braccio orizzontale del tubo lungo, che pesca nella fiaschetta, si adatta quella estremità del tubo di zucchero che contiene il disco, toltane prima l'ovatta; finalmente si toglie il batuffolo d'ovatta dal capo libero del tubo di zucchero.

Mettendo in azione questo apparecchio (v. fig. 491) l'aria lascia dei germi sui granuli di zucchero; quelli che sfuggono vengono trattenuti dalla glicerina.

In laboratorio si fluidifica a bagnomaria della gelatina nutritiva preparata in concentrazione doppia della solita (doppia anche per ciò che spetta al peptone ed al cloruro di sodio), e 10 cmc. di essa si versano nella fiaschetta, che poi si adagia in piano: si ha così una coltura a piatto, nella quale i batteri si trovano come in una ordinaria gelatina nutritiva, con l'aggiunta del 2.5 % di glicerina.

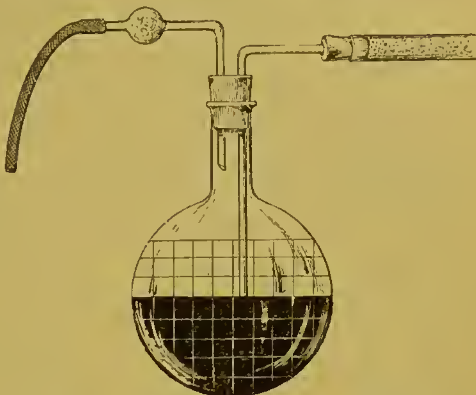


Fig. 491. — Apparecchio di Casagrandi, pronto per l'esperienza.

Lo zucchero contenuto nel tubo si distribuisce dentro una o più scatole di Petri, e sopra vi si versa della gelatina nutritiva ordinaria liquefatta, agitando cautamente. Si hanno così delle colture a piatto.

Siccome alla parete del tubo possono rimanere aderenti dei germi insieme con della polvere di zucchero, esso chiudesi da un capo con un tappo di gomma sterilizzato, vi si versa dentro un po' di gelatina, si chiude l'altro capo con ovatta, e si allestisce una coltura arrotolata.

Per conoscere il numero dei germi coltivabili contenuti nel volume d'aria osservato, bisogna sommare le colonie nate nella fiaschetta Roszahegyi, quelle della coltura a piatto e quelle della coltura arrotolata.

Ricerca di forme patogene.

Più che nell'aria si ricercano nella polvere che si può sollevare dai pavimenti, dalle pareti, dai tappeti, ecc. In ogni modo l'aria si fa gorgogliare in un liquido, come col metodo Sanfelice; oppure si fa passare prima attraverso un filtro di zucchero e poi gorgogliare nel liquido, come col metodo Casagrandi.

Il liquido, nel quale, avendo usato il secondo metodo, si versa e si scioglie anche lo zucchero, si riduce a piccolo volume, evaporandolo a 37°: nel residuo si ricercano i batteri patogeni.

La dimostrazione del bacillo della tubercolosi si fa inoculando il liquido nelle cavie (v. Parte speciale).

Quella del diplococco della polmonite, inoculando il liquido nei conigli (v. Parte speciale).

Enumerazione dei risultati dell'esame batteriologico dell'aria.

I dati che deve fornire l'esame batteriologico dell'aria sono:

1° il numero totale dei batteri contenuti in un metro cubo d'aria;

2° il numero e la qualità delle specie;

3° il numero delle colonie fluidificanti rispetto alle non fluidificanti;
4° il numero delle colonie cromogene rispetto alle acromogene;
5° il numero delle colonie di attinomiceti, blastomiceti, ifomiceti;
6° la presenza o assenza di batteri patogeni speciali.

L'importanza e le variazioni della flora batterica dell'aria secondo le stagioni, gli ambienti, le altitudini, l'umidità ed altre condizioni metereologiche, geografiche, sociali, sono discusse nel vol. II, pp. 217-218.

III. — ESAME BATTERIOLOGICO DEL TERRENO.

Prelevamento.

Per il prelevamento del terreno superficiale si usa un cucchiaino di platino, *il cucchiaino di Fränkel* (v. fig. 492 *a*), che ha per lo più la capacità di un ventesimo di centimetro cubico, e si sterilizza al calore.

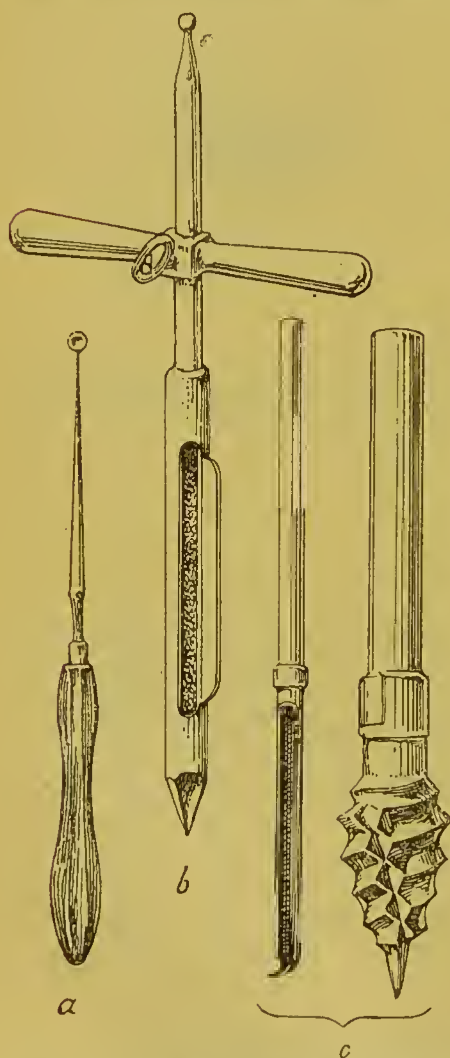


Fig. 492. — *a*, cucchiaino di Fränkel; *b*, trivella di Fränkel; *c*, trivella di Nagel.

Per il prelevamento del terreno in profondità si adopera la *trivella di Fränkel* o *quella di Nagel.*

La *trivella di Fränkel* (v. fig. 492 *b*) consiste in un'asta di ferro della lunghezza di 1 m., provvista ad un'estremità di un lungo cilindro cavo, che ha un'apertura longitudinale, ed è munita di un perforatore, che può essere a vite. Dentro il cilindro cavo sta una larga doccia, o navicella che vogliam dire, girevole sull'asse da destra a sinistra e viceversa, e provvista di un lungo labbro d'arresto. Prima di servirsene, bisogna sterilizzare la trivella: perciò si passa prima alla fiamma, poi si chiude la scanalatura ed il tutto si avvolge in carta bibula e si sterilizza a secco.

Al momento del bisogno, si svolge la carta bibula, e s'introduce la trivella sterilizzata nel suolo, girandola da sinistra a destra: arrivati alla profondità voluta, si gira in senso contrario per aprire la scanalatura e riempirla di terreno; si torna quindi a girarla da sinistra a destra per richiuderla, e poi sempre nello stesso senso fino ad estrarla.

La *trivella di Nagel* (v. fig. 492 *c*) serve per raccogliere il terreno al di sotto di metri 1.50 di profondità. Essa può approfondarsi nel terreno fino a 10 m. È costituita da un tubo cavo che termina con una robusta spirale dal contorno spezzato e con l'estremo forato. Dentro al tubo

se ne introduce un altro che in basso porta una lunga camera a doccia e termina mucronato. Fatta pervenire la trivella, già prima sterilizzata, alla profondità voluta, si spinge il tubo interno e gli si imprimono dei movimenti di rotazione in modo che il terreno entri nella camera; quindi si estrae. In laboratorio, si toglie il terreno prelevato dalla navicella o dalla doccia, e si procede alle operazioni qui sotto descritte.

Colture.

Il terreno prelevato non si semina tal quale, ma si tratta prima con acqua allo scopo di farvi passare in sospensione possibilmente tutti i germi che esso contiene. Possono adoperarsi i seguenti metodi.

Metodo ordinario.

Una quantità ben pesata del terreno prelevato, intorno al mezzo grammo, si mette in mezzo litro di acqua distillata sterilizzata, e si agita ben bene a tondo qualche centinaio di volte. Ciò fatto 1 cmc. di quest'acqua si aggiunge a 99 cmc. di acqua sterilizzata, contenuta in un matraccio, e si agita poche diecine di volte. Si hanno così due sospensioni diverse del terreno.

Della prima sospensione si allestiscono 3 colture a piatto in gelatina, seminando cmc. 0.5 per ciascuna; altrettante se ne allestiscono della seconda sospensione seminandone un cmc.

Il resto dell'esame si continua come se si trattasse di acqua.

Metodo Casagrandi.

Il Casagrandi ha costruito un apparecchio (v. fig. 493), col quale si può seguire un procedimento simile a quello, che qui si tralascia, di Emmerich. Esso è composto di due cilindri metallici, dei quali il superiore *A* porta una vite *a* impiantata esternamente sul fondo e circondata da forellini sul contorno del suo impianto.

In alto il cilindro possiede un attacco cilindrico cavo *b*; questo è congiunto, mediante un tubo di gomma, con un tubo di vetro fornito di un'ampolla contenente dell'ovatta *e*, ed il tubo di gomma è stretto da una pinza a pressione *c*.

Il cilindro inferiore *B* porta in basso, come il superiore porta in alto, l'attacco *f* per un tubo di gomma *h*, cui però è innestato un tubetto di vetro conico coll'apice in basso: anche qui il tubo di gomma porta una pinza. In alto, presso *i*, questo cilindro possiede internamente un cercine sul quale è adattata una fitta rete metallica Z e sopra a questa una solcatura a madrevite, nella quale si fa girare un disco metallico *C*, esternamente solcato a vite, fino a che la rete sottostante ne resti

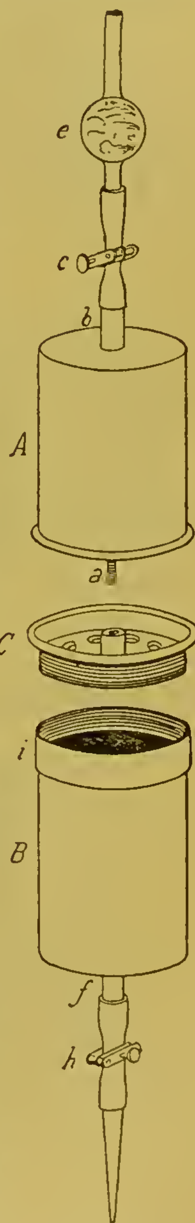


Fig. 493. — Apparecchio di Casagrandi.

compressa. Dal centro del disco s'inalza una ghiera a madrevite, nella quale si fa girare la vite del cilindro superiore, fino a che questo non combaci con l'inferiore: una adesione più sicura si ottiene interponendo un cerchio di gomma fra gli orli de' due cilindri.

L'apparecchio si sterilizza nella pentola di Koch, prima in pezzi separati, poi ricomposto e involto in carta bibula.

Nel momento di servirsene, si svita il cilindro superiore; sul disco si sparge il terreno e sopra vi si versano 50-100 cmc. di acqua distillata, si riavvita il cilindro svitato, e si sbatte fortemente. Si allenta allora la pinza superiore, poi la inferiore, e l'acqua di lavaggio che cade dal tubetto conico si raccoglie in matraccio sterilizzato.

L'operazione si ripete 5-10 volte; e della mescolanza di tutte le porzioni d'acqua di lavaggio si allestiscono le colture nel modo già detto.

Oltre che gli aerobi, si ricercano nell'acqua di lavaggio anche gli anaerobi, sia col metodo ad alto strato, sia con quello delle colture a piatto (v. p. 1269).

Ricerca di batteri patogeni.

La ricerca dei batteri patogeni nel terreno si fa trattando l'acqua di lavaggio con quei metodi speciali che sono stati indicati nell'esame batteriologico dell'acqua.

Per la dimostrazione del bacillo del tetano si può ricorrere direttamente all'inoculazione dell'acqua di lavaggio, ridotta a piccolo volume mediante l'evaporazione a 37°, in animali recettivi, specialmente nella cavia (v. Parte speciale). Similmente si fa per i bacilli dell'edema maligno, del carbonchio sintomatico, della tubercolosi, ecc.

Enumerazione dei risultati dell'esame batteriologico del terreno.

I dati che deve fornire l'esame batteriologico del terreno sono:

1° il numero totale dei batteri contenuti in un grammo di terreno;
2° il numero e la qualità delle specie;
3° il numero dei batteri fluidificanti rispetto ai non fluidificanti;
4° il numero dei batteri cromogeni rispetto agli acromogeni;
5° il numero degli attinomiceti, blastomiceti, ifomiceti;
6° le specie degli anaerobi;
7° la presenza o assenza di batteri patogeni speciali.

Il valore della flora batterica del terreno è discusso nel vol. II, pp. 352 e seg.

BATTERIOLOGIA GENERALE.

A. — CLASSIFICAZIONE.

Vi sono diverse classificazioni, più o meno semplici: secondo quella abbastanza complessa di A. Fischer, che oggi appare scientificamente la più accettabile, benchè pur essa come le altre abbia valore provvisorio, i batteri si dividono in ordini, famiglie e sottofamiglie, generi e specie; i primi quattro gradi sono definiti per caratteri morfologici, mentre le specie, in mancanza di questi, sono distinte con semplici criteri fisiologici.

Non è qui il caso di riprodurre la classificazione del Fischer; ricordiamo soltanto che i suoi due ordini sono quello degli *Aplobatteri*, o batteri semplici, aventi un corpo vegetativo unicellulare, e quello dei *Tricobatteri*, o batteri filamentosi, col corpo vegetativo pluricellulare. Gli Aplobatteri comprendono tre famiglie, *Coccacee*, *Bacillacee*, *Spirillacee*; i Tricobatteri due, *Beggiatoacee* e *Clamidobatteriacee*.

La classificazione di Fischer comprende, oltre gli schizomiceti di Nägeli, che corrispondono agli aplobatteri, anche i tricobatteri; ma esclude gli attinomiceti. Dando però alla parola batteri un significato amplissimo, vi si possono comprendere anche gli attinomiceti, non senza però avvertire che dagli schizomiceti si differenziano così i tricobatteri come gli attinomiceti, per più caratteri morfologici e biologici, accostandosi i primi ad alcune forme di alghe inferiori ed i secondi ad alcuni ifomiceti.

Fatta questa considerazione, e riconoscendo che la divisione di Fischer in sottofamiglie non corrisponderebbe all'indole pratica di questo manuale, passiamo dalle famiglie direttamente ai generi, ed accettiamo per questi quasi esclusivamente i nomi adottati da Lehmann e Neumann, la cui classificazione per la semplicità sua ci sembra maggiormente convenire al nostro scopo, che è quello di seguire un comodo schema di trattazione, pur senza derogare ai principî scientifici fondamentali.

Ordini	Famiglie	Generi
Haplobacteria	*Coccaceae*	*Sarcina*
		Streptccoccus
		Micrococcus
	Bacillaceae	*Bacillus*
		Bacterium
	Spirillaceae (1)	*Vibrio*
		Spirillum

(1) Qui si tace il genere *Spirochaeta*, che, essendo considerato come protozoo, è trattato in Protozoologia.

Ordini	Famiglie	Generi
Trichobacteria	*Beggiatoaceae*	*Beggiatoa*
	Chlamydobacteriaceae	*Chlamydothrix*
		Thiothrix
		Crenothrix
		Chladothrix
Actinomycetae		*Mycobacterium*
		Corynebacterium
		Actinobacterium
		Actinomyces

B. — PROPRIETÀ MORFOLOGICHE.

Forma.

I batteri in generale hanno forma semplicissima; di sfera o ellissoide allungato, di cilindro diritto, di cilindro avvolto a spirale. Oltre queste

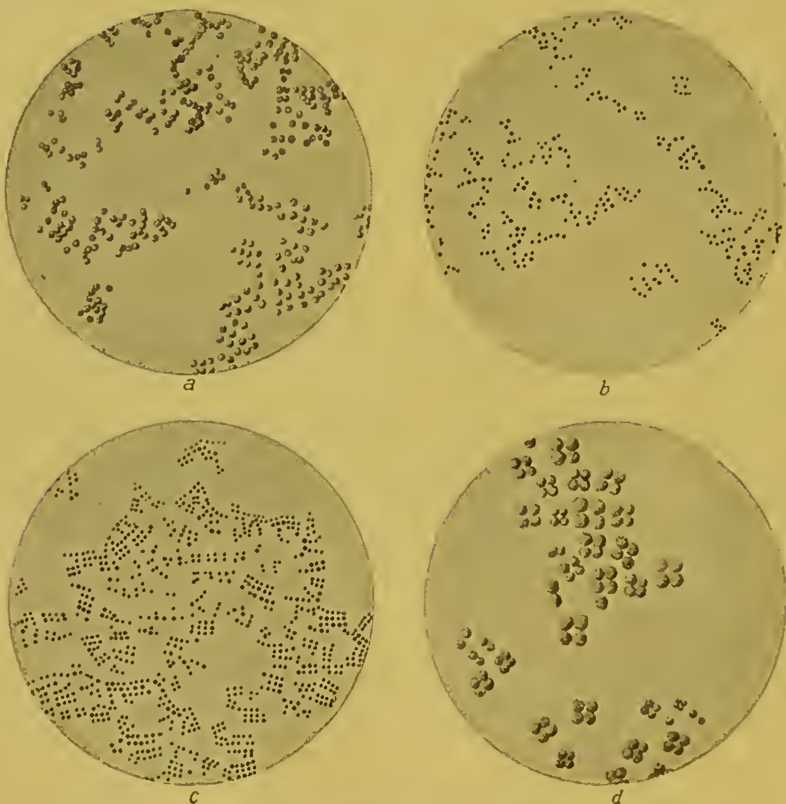


Fig. 494. — Cocchi: *a* e *b*, irregolarmente aggruppati, grandi e piccoli; *c* e *d*, regolarmente aggruppati, grandi e piccoli.

forme tipiche, fondamentali, altre ve ne sono, che però tutte si possono considerare come alterazioni di quelle: così la forma a bozzolo o a biscotto, la forma clavata, la fusata, quella di manubrio, ecc. Solo negli

attinomiceti o streptotrichee esistono vere e proprie ramificazioni, ed accenni di esse in alcuni rari schizomiceti, in condizioni speciali.

La forma esteriore, mancando altri più importanti caratteri, è stata

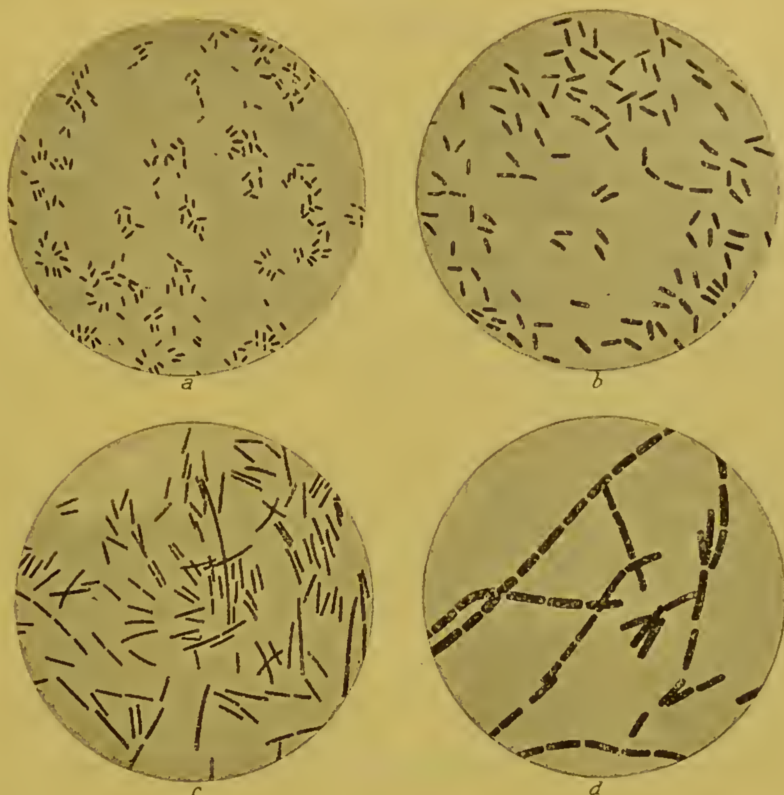


Fig. 495. — Forme a bastoncino: *a*, piccolissime; *b*, mezzane; *c*, lunghe; *d*, riunite in catena.

presa appunto come criterio di classificazione degli schizomiceti in famiglie, che sono le *Coccacee*, costituite dalle forme rotonde o rotondeggianti (v. fig. 494), le *Bacillacee* dalle forme cilindriche diritte (v. fig. 495), le *Spirillacee* dalle forme curve e spirali (v. fig. 496).



Fig. 496. — Spirilli.

Oltre alle forme tipiche, quali si notano in grandissima prevalenza nelle colture freschissime, i batteri possono assumere aspetti anomali diversissimi, che sono di natura involutiva o degenerativa o teratologica. Così vedonsi forme raccorciate o allungate, ingrossate o assottigliate, contorte o angolose, rigonfiate in uno o più punti, in forma di cunei, di clave, di manubri, di fusi, di spermatozoi. In alcune specie batteriche tali forme anomale si producono più facilmente che in altre; e se ne profitta a scopo diagnostico, come accade per il *Bact. pestis*. Il cloruro di sodio, aggiunto ai sostrati colturali in proporzione

del 3 %, il cloruro di magnesio o di calcio o di litio al 4 %, favoriscono in molte specie la produzione di individui abnormi.

Dimensioni.

Le forme rotonde hanno per lo più un diametro di 0.6-0.8-1 μ, qualcuna di solo ⅓ μ, altre di più che 1 μ.

Si dicono ellissoidali quelle forme che hanno il minore diametro di ⅓-1 μ ed il maggiore doppio, al più, del minore.

Le forme cilindriche diritte hanno la maggior parte un diametro di ⅓-1 μ o poco più, e sono lunghe 2-4-8 volte più che larghe, quindi fino a 6-8 e più μ. Ma si conoscono anche forme non patogene, molto più grandi, giganti fra i batteri, larghe fino a 3-6 μ e lunghe fino a 60-80 μ: esempio il *Bacillus bütschlii*.

Le forme cilindriche spirali hanno a un dipresso le stesse dimensioni delle cilindriche diritte, ed anche fra esse trovansi forme gigantesche, come per es. lo *Spirillum volutans*. Possono essere formate da appena mezza spira, o da una intera e più: da questa distinzione derivano i due generi delle Spirillacee, che sono il *Vibrio*, di mezza spira, lo *Spirillum*, di una o più spire.

Aggruppamenti.

Di parecchie specie batteriche si vedono gl' individui irregolarmente sparsi nel campo microscopico, senza che mostrino alcun ordinamento speciale. Molti batteri però presentano aggruppamenti caratteristici.

Le forme rotonde raramente si presentano isolate e sparse, assai più spesso sono accoppiate, o riunite in catenelle di 4-8-10 fino a parecchie diecine di elementi, o in quadrati di quattro, o in cubi di 8-16-32-64 elementi, ovvero in accumoli irregolari somiglianti a grappoli (vedi fig. 494).

Le forme cilindriche diritte si mostrano spesso isolate, sparse o in mucchietti irregolarissimi; ma non di rado anch'esse riunisconsi a due a due, l'una dietro l'altra, o in catenelle di molti individui; ovvero in serie d'individui l'uno accanto all'altro parallelamente disposti, oppure con l'estremità raccolte, quasi a contatto, da una parte, e dall'altra come divaricate, a mo' delle stecche d'un ventaglio.

Le forme curve fatte di spire intere si presentano isolate; quelle di mezza spira si uniscono a due, con le curve opposte, in forma di **S**, o in forma di **V**, ed anche possono formare catenelle di più individui, con le curve alternatamente opposte.

La varia maniera d'aggrupparsi delle forme rotonde è servita per

distinguere fra le Coccacee tre generi: lo *Streptococcus*, che dà catenelle, la *Sarcina*, che forma cubi, il *Micrococcus* (*Staphylococcus* sinonimo *pro parte*), che si riunisce in grappoli.

Struttura.

Tutti i batteri sono formati da un *corpo protoplasmatico* e da una *membrana*, che quasi rigidamente lo limita. Alcuni hanno anche delle finissime appendici filiformi, o *ciglia;* altri pochi intorno alla membrana possono presentare un invoglio più o meno spesso, che dicesi *capsula*; altri ancora nel loro corpo fanno vedere, in certe condizioni, degli elementi rotondeggianti, che servono alla conservazione della specie ed alla riproduzione, e diconsi *spore*; altri finalmente dimostrano inclusi o differenziati nel protoplasma *granuli* di natura diversissima.

Protoplasma.

Molto discussa è stata, ed ancora non è con sicurezza risoluta, la questione della struttura del protoplasma, e della presenza di un nucleo in esso.

Pensando all'estrema piccolezza della maggior parte dei batteri ed al limite del potere d'ingrandimento e di risoluzione del microscopio, si comprende agevolmente la scarsezza e l'incertezza dei risultati di questo genere d'indagini. Toccheremo tuttavia di alcune osservazioni fatte in pochi grossi esemplari batterici.

A. Fischer nel *Chromidium okenii* distingue l'ectoplasma, semisolido, in immediato contatto della membrana, dal succo cellulare fluido, posto nella parte centrale, quindi racchiuso nell'ectoplasma. Egli ha visto inoltre un grosso granulo, e l'ha interpretato come nucleo, per le sue reazioni microchimiche.

Ziemann nel *Bac. anthracis* ha visto non uno, ma più granuli, che ha interpretati di natura cromatinica per il loro comportamento verso il metodo Romanowsky.

Feinberg, Zettnow ed altri pensarono invece che tutto il corpo batterico, quale comunemente si osserva, compresa la membrana che lo involge, costituisce il nucleo, o meglio l'entoplasma ripieno di sostanze nucleari, e che l'ectoplasma è rappresentato da un più o meno sottile alone, che circonda la membrana, e che si mette in evidenza con artifizi speciali.

F. Schaudinn ha avuto occasione di osservare direttamente, nei due giganteschi esemplari *Bacillus bütschlii* e *Bacillus sporonema*, la struttura alveolare del protoplasma, quale fu descritta da Bütschli per le cellule degli organismi superiori, cioè lo spartimento in tante concamerazioni poliedriche, piene di succo cellulare. Nei punti nodali degli alveoli Schaudinn osservò dei granuli molto refrangenti, che si tingono coi colori nu-

cleari (v. fig. 497). Ricordiamo ancora le osservazioni di Ottolenghi e di Ruzicka, secondo le quali il corpo del B. del carbonchio, in alcuni stadi almeno del suo sviluppo, risulta costituito di granuli riuniti fra loro da sottili prolungamenti disposti a reticolo. Non è facile mettere d'accordo i fatti osservati dai diversi autori, ed in ogni modo non è prudente generalizzare le loro osservazioni per dire che tutti i batteri siano costituiti nell'uno o nell'altro modo.

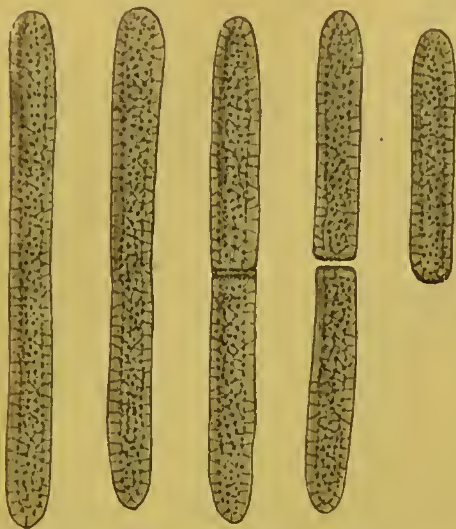


Fig. 497. — *Bac. bütschlii*, struttura alveolare e divisione (da Schaudinn).

Tuttavia, per ciò che riguarda il nucleo, rileviamo che Schaudinn non ne ha visto, e che l'interpretazione data dal Fischer a' suoi granuli non è incontrastata. D'altra parte però vi sono argomenti indiretti, certo non assoluti ma probabili, per ammettere che nel corpo batterico vi siano delle sostanze nucleari, o per lo meno sostanze che possono considerarsi ad esse equivalenti. Anzitutto il corpo batterico è una cellula, e non è strana cosa il pensare che in esso vi sia qualche cosa che almeno tenga le veci del nucleo, che si trova in tutte le altre cellule, salvo quelle di alcune alghe; in secondo luogo, il corpo batterico ritiene avidamente i colori basici o nucleari; in terzo luogo è noto che dalle colture di molte specie batteriche si possono, con procedimenti chimici, estrarre nucleine o nucleoproteidi, che sono anche componenti chimici essenziali dei nuclei delle cellule superiori.

Tenendo dunque conto di queste considerazioni, possiamo dire che nel semplicissimo corpo batterico manca un nucleo morfologicamente differenziato, ma che vi sono sparse, in forma di granuli, delle sostanze nucleiniche quali abbondano nei nuclei cellulari.

Per ciò che concerne la colorabilità del corpo batterico, prescindendo dai particolari di struttura, è noto come in generale esso abbia una forte avidità per i colori basici d'anilina. In particolare però bisogna avvertire che siffatta avidità è di vario grado, presumibilmente anche di varia natura, e che usando metodi speciali di colorazione, con mordenti e differenziatori, si possono distinguere fra loro specie batteriche diverse.

Ricordiamo in tal proposito il comportamento dei corpi batterici rispetto al metodo di Gram e rispetto ai metodi in uso per dimostrare l'acidoresistenza.

Nel metodo di Gram si ammette che si formi una combinazione, una specie di lacca, fra protoplasma, colore e iodio: in presenza dello iodio e sotto l'azione dell'alcool, alcune specie batteriche ritengono avi-

damente il colore d'anilina (resistenti al Gram), altre lo abbandonano insieme con lo iodio, e restano scolorate (non resistenti al Gram).

Nei metodi di Ziehl-Neelsen e di Koch-Ehrlich alcune specie ritengono avidamente il colore anche sotto l'azione di forti decoloranti, quali sono l'acido solforico ed il nitrico (specie acidoresistenti), mentre altre lo abbandonano facilmente (non acidoresistenti).

Tanto la resistenza al Gram quanto l'acidoresistenza si dimostrano specialmente negli esemplari giovani delle varie specie resistenti, non più nei vecchi o degenerati; talora accade che in uno stesso individuo si riscontrino alcuni tratti resistenti ed altri no.

L'acidoresistenza è dovuta, in buona parte almeno, alle sostanze grasse e ceree (Celli e Guarnieri, De Giaxa ed altri), di cui abbondano alcune specie, come il B. della tubercolosi, i bacilli paratubercolari ed alcuni attinomiceti.

Membrana.

Nei comuni preparati la membrana si colora tutt'insieme, ed ugualmente, col protoplasma, e però non si distingue. Ma ricorrendo alla tintura di iodio o a reattivi che provochino la plasmolisi, la membrana si può vedere separata dal protoplasma. Abbiamo già ricordato che, con artifizi speciali, si vede intorno alla membrana propriamente detta un alone più lasso, di aspetto gelatinoso, e che Bütschli ed altri lo interpretarono come ectoplasma. Altri lo considerano come un semplice strato esterno della membrana, la quale quindi sarebbe composta di questo, gelatinoso, e di uno strato interno, cuticolare. Uniformandoci a questa veduta, aggiungiamo che in alcuni batteri filamentosi lo strato esterno, invece di apparire come più rammollito rispetto all'interno, mostrasi ispessito e rigido, per modo che il corpo batterico con la sua membrana, cioè con lo strato cuticolare di essa, vi resta libero come dentro una guaina.

Capsula.

Col nome di capsula s'intende quell'involucro assai evidente, spesso molto largo, che circonda la membrana di alcuni batteri, specialmente patogeni, allorchè si trovano negli umori o tessuti dell'organismo animale, e quando si coltivano in adatti terreni speciali. La fascia che essa forma intorno alla membrana può essere larga 2-4 volte e più dello stesso corpo batterico (v. fig. 408). La capsula del B. del carbonchio, a differenza di quella di altri germi, è, secondo Ottolenghi, radialmente striata, composta di più o meno delicate trabecole, che partono dal contorno bacillare, e probabilmente si anastomizzano: la capsula talora si vede rivestita di uno strato amorfo, ed in talune circostanze tutta quanta assume aspetto omogeneo. Ha apparenza, non natura, gelatinosa. Probabilmente risulta dalla trasformazione di sostanze proteiche e carboidrate del-

l'organismo, per effetto dell'attività biochimica dei batteri stessi, con successiva deposizione del prodotto di trasformazione attorno al loro corpo.

Secondo Preisz, la sostanza capsulare somiglia chimicamente alle mucine; e sotto quest'aspetto Ottolenghi ha dimostrato l'importanza che



Fig. 498. — Capsule.

alcuni idrati di carbonio, insieme con le sostanze proteiche del siero di sangue, hanno nella formazione della capsula: aggiungendo infatti del glicogeno o del glicosio a dei sieri già modificati al punto da non essere più per sè soli propizi alla produzione delle capsule (sieri esauriti da un precedente sviluppo di forme capsulate), il fenomeno si ripresenta vivace e rigoglioso. Lo stesso effetto, salvo le differenze di grado, si ottiene con l'aggiunta di levulosio o saccarosio, ed anche di galattosio, non con l'aggiunta di lattosio o raffinosio o di alcuni pentosi.

Ciglia.

Sono delicati organelli filamentosi, straordinariamente fini, molto lunghi, flessibilissimi, impiantati sul corpo batterico, che non si vedono nei preparati comuni, e dei quali sono provviste molte specie batteriche: alcune di queste le possiedono in un periodo della loro vita, in un altro ne mancano. Spesso nelle colture si trovano ciglia staccate dal corpo batterico, e talora sono in gran numero riunite a formare eleganti grovigli (v. fig. 499).

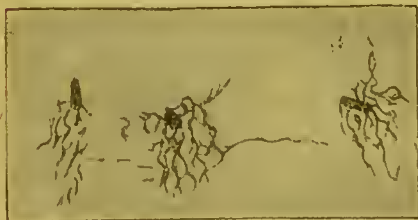


Fig. 499. — Ciglia.

Tutte le specie mobili ne sono fornite, ad eccezione delle beggiatoe mobili; però vi sono anche alcune specie immobili (David Ellis) che ne possiedono. Quindi se i batteri mobili,

fatta la ricordata eccezione, sono ciliati, non è altrettanto esatto asserire che tutti i ciliati sono mobili.

Alcuni batteri hanno un solo ciglio, altri poche ciglia, altri moltissime, fin quasi un centinaio. Secondo Messea, per il numero e la disposizione delle ciglia, i batteri si dividono in

monotrichi, con un solo ciglio polare: esempio, *Bacterium pyocyaneum*;

anfitrichi, con due ciglia, uno per polo: esempio, *Spirillum volutans;*

lofotrichi, con un ciuffo polare di ciglia: esempio, *Bacterium syncyaneum;*

peritrichi, con tutta una raggiera di ciglia: esempio, *Bacterium vulgare.*

Spore.

Vi sono dei batteri che, oltre a moltiplicarsi per divisione diretta, producendo sempre forme vegetative, assicurano la conservazione della loro specie e la riproduzione, formando corpicciuoli di speciale resistenza, che si dicono *spore.* Si producono nel corpo batterico, dentro della membrana, e perciò diconsi anche *endospore*: *sporogeni* si chiamano i batteri che possono formare endospore, *asporogeni* tutti gli altri. Per alcuni di questi, p. es. il vibrione del colera, il bacillo del tifo, ecc., sono state descritte, ed interpretate come spore, delle formazioni speciali, che nascerebbero dalla diretta trasformazione di alcuna fra le forme vegetative di un aggruppamento, ovvero di una sua porzione terminale, disgiunta dal resto del corpo: fu loro dato il nome di *artrospore,* ma non si hanno argomenti bastevoli per affermarne la natura sporale. Dicendo spore, intenderemo dunque sempre endospore.



Fig. 500. — Presunte artrospore in una serie di cocchi.

Ogni individuo può dare una sola spora, eccezion fatta per il *Bac. bütschlii* e per la *Dispora caucasica,* nelle quali specie una stessa forma vegetativa produce due spore.

Le spore hanno aspetto rotondo od ellittico, col diametro maggiore che può essere fin doppio del minore. Si possono vedere nel mezzo, o quasi, del corpo batterico, *spore centrali,* o in una delle estremità, *spore terminali.* Possono avere il minor diametro quasi uguale allo spessore del corpo batterico, di guisa che questo conservi la sua forma di bastoncino, ed allora, secondo Fischer, diconsi *battridi* (v. fig. 501 *a*) i bacilli che le contengono, es. il bacillo del carbonchio; possono, crescendo nel mezzo, aver rigonfiato il corpo batterico in modo che questo prenda la forma di un fuso, ed i bacilli si chiamano *clostridi* (v. fig. 501 *b*), es. il bacillo dell'edema maligno; e finalmente possono, essendo terminali, avere un diametro assai maggiore del corpo batterico, il quale allora

prende la forma di una bacchetta da tamburo, e questi si denominano *plettridi* (v. fig. 501 *c*). Naturalmente queste tre voci hanno valore puramente descrittivo, non classificatorio.

Nei preparati, oltre alle spore ancora chiuse nel corpo batterico, se

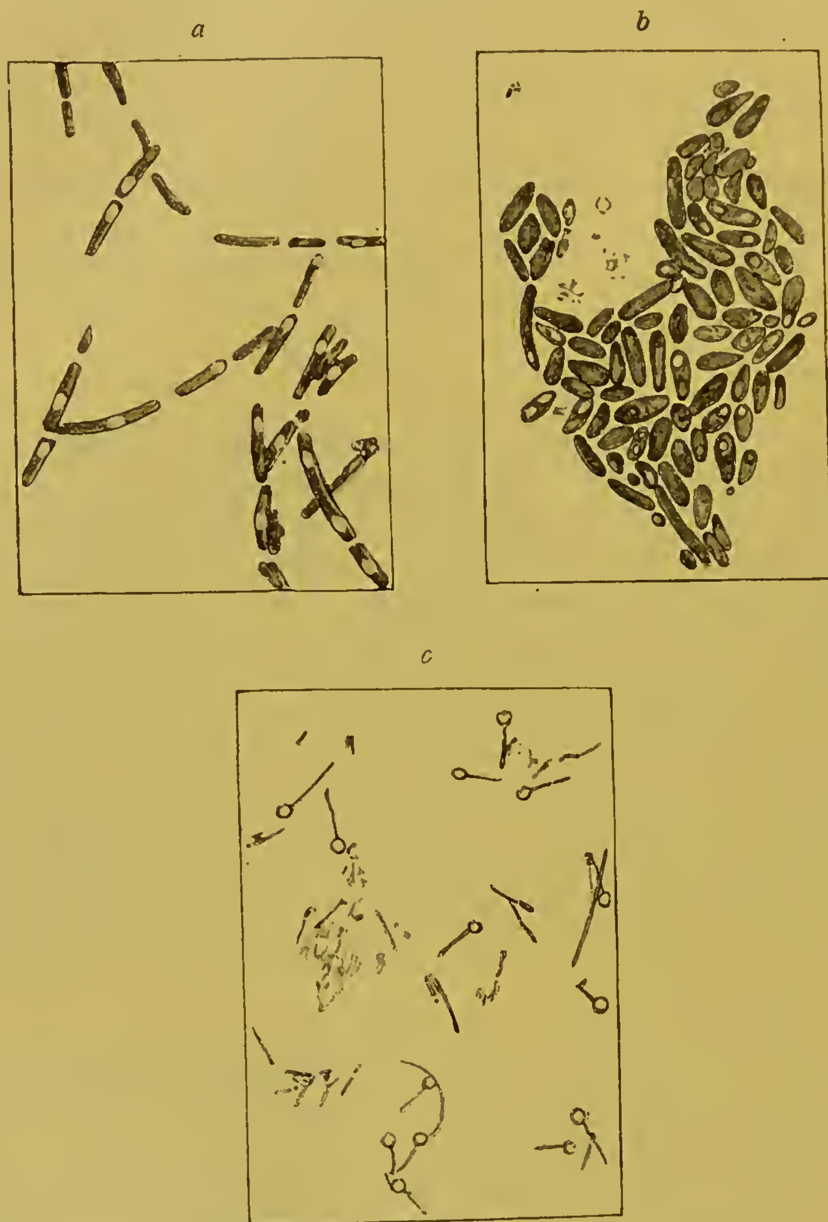


Fig. 501. — Bacilli sporificati: *a*, battridi; *b*, clostridi; *c*, plettridi.

ne vedono altre isolate, essendo già perite le forme vegetative genitrici.

Le spore perfette hanno un corpo circondato da membrana molto resistente, e la maggior parte richiedono metodi speciali per essere colorate (v. p. 1237). La membrana è bistratificata: lo strato esterno dicesi *esosporio* od *esina*, l'interno *endosporio* o *entina*. Alcune spore hanno

superficie liscia, altre rugosa, altre infine sono provviste di appendici di vario aspetto.

Della proprietà di formare o non formare spore si sono avvalsi Lehmann e Neumann per distinguere i due generi delle batteriacee: *Bacillus*, che produce spore; *Bacterium*, che non ne produce.

Granuli.

Anzi tutto bisogna ricordare come, prima che le spore siano perfette, si possono osservare nel corpo batterico dei granuli, che ne rappresentano l'abbozzo e che diconsi *granuli sporogeni*. Sono stati riconosciuti nel B. del carbonchio, nel quale però si trovano anche granuli di tutta altra natura: siccome i metodi di colorazione adoperati dai diversi autori sono differenti, così non è facile in genere comparare e identificare i risultati delle loro osservazioni. I granuli sporogeni descritti da Bunge si colorano col liquido di Loeffler anche bollente; non si può dire se essi equivalgano od abbiano qualche rapporto coi granuli che Krompecher dimostrò colorando i bacilli con soluzione carbolica di turchino di metilene, e che sono rispetto a questa cromotropi. Così pure non si può dire quale relazione abbiano i granuli descritti dai due autori nominati con quelli colorabili col rosso neutro, ai quali Ottolenghi fondatamente inclina a riconoscere importanza nella genesi delle spore, o con quelli descritti da Dietrich e Liebermeister e riconosciuti capaci di attivare l'ossigeno atmosferico.

In alcune specie batteriche, benchè non sempre, esistono uno, due o più granuli, di natura incerta, che hanno un comportamento cromotropo rispetto ai colori metacromatici, e che usualmente diconsi *granuli metacromatici:* sono noti anche col nome di *granuli di Babes-Ernst*, dal nome di chi li scoprì e di chi li studiò per primo, o di *granuli polari* (v. fig. 502) per la posizione che hanno in alcune specie batteriche, come per es. nel bacillo della difterite. Granuli di Babes-Ernst sono stati riconosciuti anche nel *Bac. anthracis:* si distinguono dai granuli sporogeni perchè non resistono all'azione del liquido di Loeffler bollente, che li distrugge.



Fig. 502. — Batteri con granuli polari.

Delle specie cui son propri tali granuli non tutti gli individui, nè in ogni momento della loro esistenza, se ne mostrano provvisti; la loro presenza o mancanza è stata da taluni messa in rapporto col possesso o con la perdita di importanti funzioni vitali, quali sono l'enzimatica e la tossica.

Ma questa asserzione, e quella della loro natura cromatinica, non sono ben dimostrate: altri crede si tratti di sostanze di riserva, pur considerandole composte di nucleina ed acido nucleinico; altri ancora li

considera come prodotti del ricambio accumulati in forma granulare. È probabile che i granuli di Babes-Ernst siano di natura chimica affine o identica alla così detta volutina (v. fig 503 *c*), di cui sono costituite le sferule dello *Spirillum volutans*, solubili in acido solforico allungato ed in soluzione satura di carbonato sodico, insolubili in alcool, etere, cloroformio.

In alcuni batteri, come per es. in certi bacilli butirrici ed in certi spirilli, si rendono evidenti, con le soluzioni di iodio, dei granuli che si tingono in turchino o in violetto, e che probabilmente constano di *granulosa*, sostanza amilacea: dico probabilmente, perchè A. Meyer crede

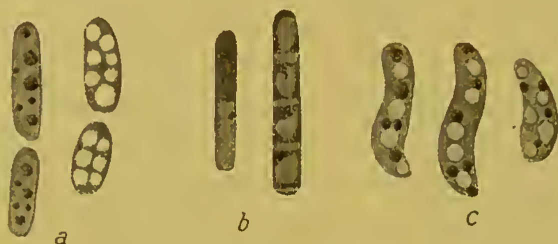


Fig. 503. — *a*, goccioline di grasso; *b*, massettine di iodogeno; *c*, sferule di volutina.

invece che tale sostanza non abbia nulla che fare coll'amido, e che essendo di natura chimica sconosciuta possa chiamarsi semplicemente *iodogeno* (v. fig. 503 *b*).

Finissimi granuli o goccioline di *grasso* (v. fig. 503 *a*) trovansi talora nel protoplasma di parecchie specie batteriche; e siccome la loro presenza è legata a condizioni nutritive sfavorevoli, così credesi che esse rappresentino l'effetto di un fenomeno simile alla degenerazione grassa, quale si osserva nelle cellule dell'organismo animale.

L'esistenza di granuli di *solfo* è peculiare dei così detti tiobatteri; come sono propri solo di qualche rara forma batterica i granuli di *clorofilla* (*Bacillus viridis*) e quelli di *batteriopurpurina* (i così detti *batteri purpurei*).

C. — PROPRIETÀ FISICHE E COMPOSIZIONE CHIMICA DEI CORPI BATTERICI.

Proprietà fisiche.

La *forma* esteriore e la *grandezza* dei corpi batterici, che sono proprietà fisiche, in quanto possono essere considerate e determinate anche nei batteri morti, indipendentemente da qualsiasi processo vitale, sono per ragioni di opportunità descritte nel capitolo delle Proprietà morfologiche, dove per un certo rispetto conviene discorrerne. Delle altre proprietà fisiche poco importerebbe parlarne, ma per amore di compiutezza si riferiscono queste poche notizie.

Il *peso specifico* dei corpi batterici è stato determinato con vari mezzi. Rubner l'ottenne pesando in un tubetto un dato volume di massa batterica, e poi un egual volume di mercurio, quindi facendo il rapporto dei pesi e riducendo all'unità di peso specifico. Stigell ricorse a questo espediente: preparata una soluzione di carbonato potassico al 50 %, e varie diluzioni graduali, per tentativi cercava in quale di esse una massa batterica prelevata con un'ansa di 5 mm. rimaneva ferma, senza montare nè scendere: il peso specifico di tale diluzione è anche quello della massa batterica. Da siffatte esperienze risulta che il peso specifico dei batteri varia con l'età delle colture. Riportiamo alcuni dati di Stigell.

Specie batterica	Agarcoltura di		Brodocoltura di 5 giorni	
	80 giorni	40 giorni	Pellicola	Sedimento
Bac. subtilis	1120	1134	931	993-1356
Bac. megatherium	1153	1159	687	965-1339
Vibrio cholerae asiat.	1275-1315	1319-1326	837	..
Micrococcus pyogenes aur.	1321	1182	..	..
» » *alb.*	1171	1191	..	..
Bac. anthracis	1177	..	..	..

Per alcune specie è stata notata una differenza, che si mantiene sempre nello stesso senso, fra i pesi specifici di colture coetanee: ecco un esempio:

	Bact. typhi	*Bact. coli*
Brodocultura di 2 giorni. . . .	1153	1210
» » 6 »	1165	1200
» » 40 »	1138	1200

Il *potere di refrazione* dei corpi batterici verso i raggi luminosi è una proprietà sulla quale si fonda l'osservazione microscopica a fresco dei batteri, come di qualunque elemento figurato in generale. L'immagine microscopica a fresco si rivela appunto per il diverso grado di refrazione che ha il corpo batterico rispetto al suo ambiente, il suo contorno rispetto all'interno, talora i diversi elementi contenutivi l'uno rispetto all'altro, e per i conseguenti fenomeni d'interferenza e di diffrazione che sono stati dimostrati ed illustrati circa la loro importanza nella visione microscopica dal celebre fisico Abbe.

Il *calore di combustione* dei corpi batterici fu misurato dal Rubner per una specie saprofita, e fu trovato di 4.02 calorie per grammo.

Composizione chimica.

Questa varia non poco, anche per una medesima specie, principalmente secondo la natura del sostrato nutritivo.

In generale il corpo batterico è composto di sostanze proteiche, idrati di carbonio, grassi, lipoidi, sali ed acqua. Prendendo ad esempio i vibrioni del colera, coltivati in liquido Uschinsky (v. p. 1258), l'acqua si trova in essi contenuta, secondo le analisi di Cramer, nella proporzione di 85.60 %; le ceneri variano dal 9.37 % al 23.63 %, secondo la quantità più o meno grande che delle medesime contiene il terreno di coltura adoperato. Le ceneri constano principalmente di sodio e di piccole quantità di potassio, cloro, acido fosforico ed acido solforico.

Le sostanze proteiche dei corpi batterici possono in grandissima parte considerarsi, conforme agli studi di Lustig e Galeotti, come nucleoproteidi. In colture disseccate di meningococco Ditthorn e Woerner trovarono il 55.64 % di proteina, il 36.8 di sostanze non azotate, il 5.94 di grasso, e di lecitina 1.62 %: le sostanze dagli autori denominate proteine vanno intese come risultanti dalla demolizione artificiale dei nucleoproteidi veri e propri, ed in tal proposito ricordiamo di volo che i nucleoproteidi batterici contengono intorno a 1-2 % di fosforo, laddove ne sono prive le proteine, e che dalla loro digestione si ottengono proteine da una parte, e dall'altra sostanze che di fosforo possiedono circa il doppio dei rispettivi nucleoproteidi e che diconsi acidi nucleinici. Dal B. prodigioso Carapelle isolò un gliconucleoproteide.

Fra gli idrati di carbonio ricordiamo il glicogeno, la cui presenza in alcuni batteri si dimostra microchimicamente, con la soluzione di iodio. E questa medesima soluzione serve anche a rendere evidenti, nel corpo dei così detti amilobatteri, una sostanza che si colora in turchino, che è pure un idrato di carbonio, ed è stata chiamata granulosa, e dal Meyer anche iodogeno, con intenzione di significare che essa probabilmente non ha nulla che fare con l'amido.

Non è inutile aver sott'occhio qualche esempio di analisi chimica delle masse batteriche.

Specie	Acqua % di sostanza umida	Su 100 parti di sostanza secca				
		Proteine	Idrati di C	Estratto etereo + Estr. alcool.	Ceneri	Residuo
B. tuberculosis (Dziergowski e Rekowski)	83.1-88.8	36.9	28.1	27.0	8.0	..
B. diphtheriae (Hammerschlag). . .	84.5	63.4	28.0	3.8	4.6	..
Bac. anthracis (Dyrmont)	80.0	42.0	..	7.1	..	20.0
Spore dello stesso (Dyrmont) . . .	85.4	70.0	..	8.7	2.0	..

D. — MOLTIPLICAZIONE DEI BATTERI.

Si distingue la moltiplicazione delle forme vegetative dalla riproduzione per mezzo di spore, le quali sono forme di resistenza, destinate ad assicurare la perpetuazione della specie.

Moltiplicazione delle forme vegetative.

Ogni individuo batterico può dare origine a due individui figli, per un processo di semplice divisione trasversale, che cade nel mezzo del suo corpo: la divisione, secondo alcuni, comincia dagli strati periferici del protoplasma, e procede in forma di strozzamento sempre più serrato.

Secondo Schaudinn, che fece le sue osservazioni sul *Bac. bütschlii* e sul *Bac. sporonema*, la divisione s'inizia non dalla periferia, ma dal centro, con la comparsa di un granulo assai refrangente, che s'ingrandisce in direzione perpendicolare all'asse maggiore del corpo bacillare, assumendo la forma di un disco: questo arriva finalmente a toccare la membrana, rappresentando allora una specie di piastra divisoria, la quale in ultimo si scinde in due parti, mentre anche la membrana si divide: così risultano i due individui figli (v. fig. 497).

Gli individui figli possono separarsi o restare uniti, e nell'uno e nell'altro caso dividersi alla lor volta.

In condizioni favorevoli, che variano da specie a specie, le divisioni seguono a brevi intervalli, i quali però diventano sempre più lunghi da un certo momento in poi, fino a che ogni ulteriore moltiplicazione cessa. Ogni generazione dura in genere dai 15 ai 30 minuti; per il vibrione del colera la media è di 20′, per il *Bact. coli* di 16-25′.

Con adatte disposizioni d'esperimento, facili ad intendersi, questi valori si possono desumere sia da osservazioni microscopiche dirette, sia dalla numerazione delle colonie in una serie di colture a piatto, seminate di tanto in tanto con una quantità costante del liquido nutritivo in cui fu posto un numero noto di batteri viventi.

Accettando una media di 30′ per generazione, ed ammettendo che questa media valga per un certo numero di ore, si può calcolare con approssimazione quanti individui risultano, dopo qualche tempo, da un numero a iniziale di forme vegetative vitali.

Dopo	la 1^a	divisione	si avranno	$2a$	individui
»	» 2^a	»	»	$2 \times (2a) = 2^2a$	»
»	» 3^a	»	»	$2 \times (2^2a) = 2^3a$	»
»	» n^a	»	»	$N = 2^n a$	»

Dall'ultima equazione generale deriva l'altra:

$$\log N = n \log 2 + \log a.$$

Essendo *n* ed *a* noti, si può trovare *N*, ricorrendo alle tavole logaritmiche.

Per dare un'idea del numero prodigioso di individui che in poche ore sono prodotti da un solo, si consideri la seguente tabella, in cui i numeri sono ottenuti per calcolo aritmetico:

Dopo	10 divisioni,	cioè	5 ore	1,024:	più di mille.
»	20 »	»	10 »	1,048,576:	più di un milione.
»	30 »	»	15 »	1,073,741,824:	più di un miliardo.
»	40 »	»	20 »	1,099,511,626,776:	più di un bilione.

Bisogna però aver presente che durante la moltiplicazione della maggior parte degli individui, parecchi di essi muoiono, e ciò consiglia di accettare le fatte considerazioni in modo approssimativo. La moltiplicazione cessa del tutto dopo un certo tempo, ed il numero degl'individui che periscono di giorno in giorno aumenta rapidamente, fino a che non muoiono tutti : la vita delle colture batteriche dunque dura fino a un certo punto, più o meno lontano secondo la specie batterica, la qualità del terreno, e varie condizioni estrinseche.

Alcuni batteri, moltiplicandosi, restano isolati ed irregolarmente distribuiti; altri invece si aggruppano in modo più o meno caratteristico.

Allorchè gli individui originati per successive divisioni parallele fra loro restano uniti, si hanno delle *catene* di cocchi o di bastoncini, secondo le specie. Nei cocchi talora la seconda divisione si compie in direzione perpendicolare alla prima, nel qual caso, restando gli elementi uniti, risultano delle *tetradi*: se una terza divisione si compie in un piano perpendicolare ai due primi piani, si forma un cubo o *pacchetto* di otto individui, e se altre divisioni succedonsi sempre perpendicolari fra loro nelle tre direzioni dello spazio, risultano aggruppamenti di 16, 32, 64 unità, nel qual caso parlasi di *balle*. Può ancora darsi, sempre nei cocchi, il caso che le divisioni si succedano in direzioni varie, irregolari, sicchè, restando gli individui uniti, si formano dei *grappoli*.

Un aggruppamento, spesso macroscopico, assai caratteristico, è quello che porta il nome di *zooglea*; ne abbiamo un esempio nello *Streptococcus mesenterioides*, temutissimo nelle fabbriche degli zuccheri, per la fermentazione destrinica che produce. In terreni zuccherati le sue catene si circondano di una capsula grandissima; parecchie catene vicine confondono le loro capsule, e ne risultano allora degli aggregati batterici, immersi in masse gelatinose: così formansi le zooglee, le quali si osservano tanto in terreni solidi quanto nei liquidi.

Moltiplicandosi nei vari sostrati nutritivi i batteri finiscono col dare ben presto origine a masse rilevanti, visibili ad occhio nudo, sotto forme diverse.

Sviluppandosi nelle *colture a piatto*, i batteri dànno origine a colonie le quali hanno forma, grandezza, superficie, colore, lucentezza, consistenza

variabili, e sono più o meno aderenti al terreno. Si distinguono le *colonie superficiali* dalle *profonde*, nate nella spessezza del sostrato.

Crescendo alla superficie di *terreni solidi*, seminati a strisciamento, producono delle *patine*, le quali, per una stessa specie, hanno a un dipresso comuni con le colonie la maggior parte dei caratteri: possono essere inoltre diffuse o limitate, continue o discontinue, cioè formate da un insieme di piccole colonie vicinissime fra loro. L'acqua di condensazione, se c'è, presenta in genere, per uno stesso germe, l'aspetto delle colture liquide.

Nei *sostrati liquidi* i batteri moltiplicandosi possono *intorbidarli* o *lasciarli limpidi*; produrre dei grumettini aderenti alle pareti delle provette; dare *sedimenti* scarsi o copiosi, fioccosi o granellosi o polverulenti, aderenti al fondo o sollevabili; formare alla superficie *pellicole*, continue o discontinue, lisce o rugose, spesse o sottili, friabili o tenaci, di vario colore, rimontanti sulla parete del tubo o pur no.

Nei terreni solidificati a cilindro e seminati per infissione i batteri dànno in generale origine ad una colonia in superficie, e lungo l'asse ad un *nastrino*, più o meno sottile, continuo o discontinuo, con o senza *barbe* laterali.

Vi sono alcune specie batteriche le quali impartiscono a tutto il terreno di coltura un dato colore.

Allorchè il terreno di coltura è la gelatina, per alcune specie vi si osserva ancora la *fluidificazione*, che avviene più o meno rapidamente, ed ha forme diverse, massime nelle culture per infissione: in queste può avanzare in forma di cilindro, di coppa, d'imbuto, di sacco.

Se il terreno di coltura è il latte, se ne può osservare per alcune specie la *solidificazione*, cioè la coagulazione, sia per virtù enzimatica sia per reazione acida; per altre specie si osserva un *rischiaramento*, che è dovuto alla peptonizzazione o meglio tripsinizzazione della caseina, oppure alla saponificazione del grasso per effetto della crescente alcalinità, o all'uno ed all'altro meccanismo insieme.

Per altre specie ancora può contemporaneamente osservarsi la *solidificazione* della parte inferiore ed il *rischiaramento* della superiore, per la successione del secondo fenomeno al primo.

La *reazione* dei terreni, che originariamente dev'essere, com'è noto, neutra o leggermente alcalina, salvo casi speciali, può rimanere *inalterata*, ovvero diventare *maggiormente alcalina* o trasformarsi in *acida*.

Il perire delle colture batteriche è dovuto sopra tutto all'esaurimento delle materie nutritive e alla produzione di sostanze nocive da parte degli stessi batteri. È facile immaginare che se dalle trasformazioni chimiche del sostrato risultano degli acidi in una certa quantità, la vita batterica non può continuarsi.

Ma si producono anche delle sostanze autotossiche specifiche di natura sconosciuta.

Il così detto *fenomeno di Marmorek* è in tal proposito istruttivo. Se

si prendono delle colture in terreni solidi bene sviluppate, per esempio di uno streptococco, e se ne toglie la massa batterica, poi si sterilizza e vi si seminano germi della stessa specie, si verifica la mancanza di qualsiasi sviluppo: se invece si trapiantano germi di altre specie, e talora diverse razze di una medesima specie, queste vi si moltiplicano come in un terreno vergine.

Sporificazione e germogliamento.

Il processo di sporificazione è stato studiato solo in alcuni bacilli. Bunge ha visto che nel *Bac. anthracis* il primo stadio di tal fenomeno è rappresentato dall' aspetto indistintamente granuloso che assume il corpo bacillare, il secondo stadio dalla formazione di granuli che rifrangono fortemente la luce, il terzo dal loro addensamento nel mezzo e dalla loro fusione, risultandone così un corpicciuolo rotondeggiante, che si trasforma poi in una spora matura.

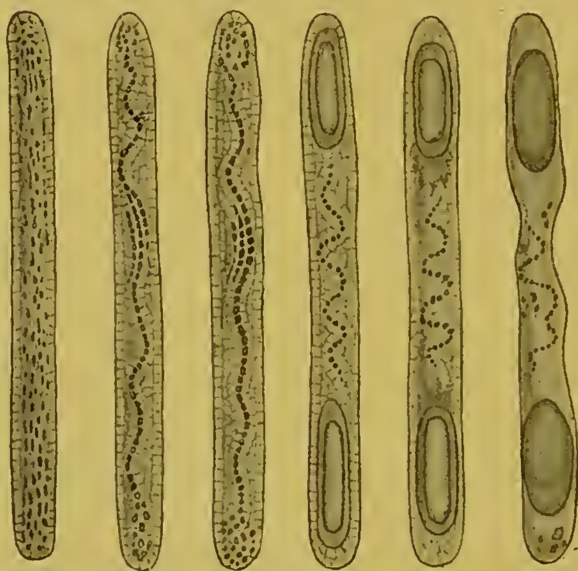


Fig. 504. — Fasi del processo di sporificazione nel *Bac. bütschlii* (da Schaudinn).

Nel *Bac. bütschlii* Schaudinn potè osservare fenomeni più complessi. Anzi tutto i granuli che si trovano nei punti nodali (v. p. 1357) si fanno più grossolani; poi compare nel mezzo del corpo bacillare un grosso granulo splendente che, come nella semplice divisione, cresce e si trasforma in piastra; questa in principio rifrange fortemente la luce, poi sempre più debolmente, fino a scomparire del tutto. Intanto s' iniziano delle correnti plasmatiche, le quali divengono sempre più vivaci, mentre le maglie alveolari si allungano a tal segno da mentire una struttura fibrillare parallela all'asse lungo del bacillo. Le correnti plasmatiche trascinano i granuli, i quali a poco a poco finiscono col disporsi in fila ondulata lungo l'asse longitudinale; da ultimo si portano verso i due poli ed ivi si raccolgono

e si addensano, costituendo gli abbozzi sporali, di forma ellissoidale. Questi si contraggono sempre più, spremendo fuori il succo cellulare, mentre i singoli granuli si fondono insieme nell' interno e gli alveoli che li circondano si ispessiscono tutt' intorno, dando origine ad una membrana con doppio contorno (v. fig. 504).

I bacilli mobili, prima di accingersi alla sporificazione, diventano per lo più immobili. Le condizioni speciali che favoriscono questo importante processo biologico sono differenti per le varie specie, e non sempre coincidono con quelle favorevoli alla moltiplicazione delle forme vegetative; anzi in generale la sporificazione avviene allorchè cominciano a diventare poco propizie le condizioni alla semplice proliferazione. Il fenomeno manca nell'organismo animale vivente.



Fig. 505. — Germinazione equatoriale.

Le spore, trovandosi in condizioni propizie, germogliano, originando le forme vegetative. Una spora all'inizio della germinazione si presenta rigonfia, e perde a poco a poco la sua forte refrangenza; indi un punto della sua membrana si rammollisce o si lacera, e ne vien fuori un bastoncino, cui spesso resta lungo tempo attaccata la membrana rotta.

La rottura avviene in alcune specie, come nel *Bac. anthracis*, in uno dei poli della spora (germinazione polare); in altre, come nel *Bac. subtilis*, si compie normalmente all'asse longitudinale dello spora (germinazione equatoriale, v. fig. 505).

Condizioni di sviluppo.

Nutrizione dei batteri.

La nutrizione dei batteri non può essere studiata nei singoli individui, bensì nelle loro colture.

Considerando tutte insieme le specie batteriche note, patogene e non patogene, per rispetto alle loro esigenze nutritive, si trovano differenze notevoli nella qualità delle sostanze necessarie a ciascuna di esse per moltiplicarsi e compiere tutte le altre funzioni vitali. Una distinzione schematica è stata fatta fra i batteri i cui bisogni di nutrizione sono ridotti al minimo, quelli che richiedono delle sostanze organiche complesse o proteiche, e quelli che non crescono bene altro che nell'organismo vivente o in terreni ed in condizioni di coltura speciali:

sono stati chiamati rispettivamente *prototrofi, metatrofi, paratrofi.* Tale divisione però, lasciata in termini così vaghi, è troppo grossolana; onde conviene precisare meglio, pur sempre con qualche arbitrio, la definizione di ciascuno dei tre nominati gruppi biologici.

Prototrofi diconsi quei batteri che non hanno bisogno di sostanze organiche, come i nitrobatteri e i nitrosobatteri, i solfobatteri, i ferrobatteri; ovvero quelli che assimilano l'azoto atmosferico in presenza di semplicissimi composti del carbonio, come i batteri assimilatori dell'azoto. I prototrofi non hanno mai azione patogena.

Metatrofi diconsi quelli per i cui processi vitali si richiedono sostanze organiche, principalmente azotate, più o meno complesse; tali sono, per esempio, i batteri della putrefazione o saprofiti, ed alcuni che possono indifferentemente condurre vita saprofitaria o moltiplicarsi in organismi viventi e produrre malattie d'infezione, onde il nome che essi portano di parassiti facoltativi o semiparassiti.

Paratrofi diconsi quei batteri la cui vita può soltanto svolgersi in organismi viventi superiori od anche in colture artificiali, purchè siano protetti contro la concorrenza di altri batteri, precisamente dei metatrofi, e nei terreni trovino quelle sostanze proteiche le quali più si confanno alle singole specie: tali sono i batteri parassiti propriamente detti, o, come anche si dice, parassiti perfetti. Così, per esempio, il gonococco ha bisogno di proteine non denaturate, il B. dell' influenza ha bisogno dell' emoglobina, il B. della tubercolosi della glicerina, ecc.

Qual che sia il gruppo cui appartengono le specie batteriche, queste possono avere preciso bisogno di una o più sostanze determinate, mancando le quali non si moltiplicano, o si moltiplicano scarsamente, senza dare fenomeni biologici caratteristici; ovvero possono accontentarsi di qualunque sostanza nutritiva pur che sia. Nel primo caso i fenomeni risultanti dai processi vitali sono per ciascuna specie costantemente gli stessi; nel secondo caso possono variare ed essere molteplici secondo la natura delle sostanze nutritive. Sotto quest'aspetto i batteri sono stati distinti in *monotrofi* e *politrofi;* ma tra questa divisione e la precedente non vi è alcun rapporto. Monotrofi sono infatti non solo quasi tutti i prototrofi, ma anche molti paratrofi, valquanto dire parassiti perfetti; monotrofi per eccellenza sono alcuni metatrofi, i quali appunto hanno ricevuto il nome specifico dai fenomeni fermentativi che singolarmente li caratterizzano, come per esempio i bacilli dell'acido lattico, quelli dell'acido butirrico, i così detti urobatteri: politrofi sono la maggior parte dei metatrofi, quindi dei saprofiti.

Le sostanze nutritive, onde i batteri si provvedono la materia e la energia occorrenti ad accrescere il loro corpo ed a svolgere le loro funzioni, non sono però sufficienti per sè sole: altre condizioni debbono intervenire, senza le quali i batteri finirebbero col perire anche nei terreni più ricchi. Cominciamo dalla

Temperatura.

Se consideriamo tutti insieme i batteri conosciuti, notiamo subito come la loro moltiplicazione possa avvenire entro limiti amplissimi, da 0° fino a 75°C.

Ogni specie ha una temperatura ottima di sviluppo od eugenesica, una temperatura minima ed una massima; al di sotto di quella e al di sopra di questa ogni moltiplicazione cessa. Secondo il grado di queste tre temperature, che diconsi cardinali, i batteri si dividono in tre gruppi.

Alcuni hanno l'*optimum* a 15-20°, il *minimum* a 0-4°, il *maximum* a 30-40°C: diconsi *psicrofili*. Altri, e fra questi sono compresi quasi tutti i patogeni, hanno in genere l'*optimum* a 35-38°, il *minimum* a 15-25°, il *maximum* a 40-45°: diconsi *mesofili*. I rimanenti hanno l'*optimum* a 50-60°, il *minimum* a 40-45°, il *maximum* a 70-75°: si chiamano *termofili* e si trovano nelle feci degli animali, nel letame, nel terreno, nelle acque termali.

Vi sono però alcune specie che mal si saprebbero porre in alcuno dei tre gruppi: per esempio, il *Bac. subtilis*, che ha il *minimum* a 6° ed il *maximum* a 50°.

È bene anche notare che le differenze fra il *maximum* ed il *minimum* sono più o meno grandi secondo le specie batteriche, come si vede dal seguente elenco.

Specie	*Maximum* —	*Minimum* =	Differenza
Un bacillo del terreno (Globig)	68	15	53
Bacillus subtilis	50	6	44
Psicrofili in genere	40	0	40
Termofili in genere	75	40	35
Bacillus anthracis	45	12	33
Vibrio cholerae	40	10	30
Bacterium diphtheriae	40	18	22
Streptococcus lanceolatus	42	25	17
Bacterium influenzae	42	26	16
Bacterium tuberculosis	42	29	13
Micrococcus gonorrhoeae	39	29	10

Essendo il nome dei germi disposto in ordine di differenze decrescenti, appare chiaro come queste siano massime per i non patogeni, medie per i patogeni facoltativi, minime per i batteri parassiti perfetti. Si chiamano *euritermi* i germi con differenze forti fra *maximum* e *minimum* di temperatura, *stenotermi* quelli con differenze piccole: i più squisiti patogeni sono per lo più stenotermi.

Fra la temperatura eugenetica dei batteri in colture artificiali e la temperatura media dell'ambiente in cui essi trovansi naturalmente v'è in generale un certo rapporto, ma non intimo. Anzi vi sono delle ecce-

zioni. Per esempio, il *Bacillus ramosus* di Frankland, il quale fu trovato nelle acque relativamente fredde del Tamigi, ha nelle colture artificiali il suo *optimum* a 38-39°.

Il vario grado della temperatura di sviluppo ha talora influenza sopra alcune proprietà dei batteri. Così il *Bacterium prodigiosum*, coltivato a 37°, non produce più il suo bel pigmento cremisino, che si manifesta invece quando le colture si sviluppano a temperature di 20-25°. Similmente possono essere attenuate, o soppresse del tutto, alcune proprietà biochimiche e patogene.

Respirazione dei batteri.

Dopo la celebre scoperta fatta dal Pasteur nel 1861 circa la natura di alcune fermentazioni, che si compiono in assenza d'ossigeno, e la loro causa microbica, furono isolati parecchi batteri la cui vita e moltiplicazione si svolgerebbe solo in assenza di ossigeno. Questi germi furono perciò distinti col nome di *anaerobi*, introdotto dallo stesso Pasteur, e contrapposti agli altri, che, avendo bisogno dell'ossigeno atmosferico, furono detti *aerobi*.

Fu però visto che parecchi aerobi si possono moltiplicare anche in presenza di poco o pochissimo ossigeno, e per loro fu proposto il nome di *anaerobi facoltativi*, precisando gli anaerobi veri con l'attributo di *assoluti*.

Se non che questi pure possono in certi casi tollerare una certa quantità di ossigeno libero, senza dire che alcuni di essi sono stati a grado a grado artificialmente adattati ad una vita aerobica, perdendo però, è ben vero, parecchie delle loro più importanti proprietà.

Riflettendo a questi fatti, nasce l'idea che la distinzione assoluta, qualitativa, fra anaerobi ed aerobi, possa essere sostituita da una distinzione puramente quantitativa. Chudiakow osservò che, se è vero che gli anaerobi assoluti crescono bene in assenza di ossigeno libero, è altresì vero che perfino i più sensibili fra loro all'azione dell'ossigeno possono ancora moltiplicarsi in un ambiente che di questo gas contenga quantità misurabili.

Così un *Bacterium butyricum*, che non cresce in un ambiente dove l'aria atmosferica abbia la pressione di 15 mm., si sviluppa abbastanza bene quando questa sia ridotta a 5 mm., il che corrisponde ad un contenuto del 0.13 % di ossigeno.

Simile osservazione è stata fatta per altri anaerobi.

D'altra parte è stato visto che degli anaerobi facoltativi possono crescere anche in assenza assoluta di ossigeno libero, e che parecchi degli aerobi più squisiti sono ancora capaci di moltiplicarsi in ambiente con una tensione d'ossigeno minore di quella che il gas ha nell'aria atmosferica.

Possiamo dunque dire in generale che tutti i batteri possono moltiplicarsi in presenza d'ossigeno: soltanto variano per le diverse specie i limiti della tensione che questo gas deve avere nell'ambiente di svi-

luppo. Come per la temperatura, così per l'ossigeno distinguiamo dunque un punto ottimo, un massimo e un minimo, tutti e tre variabili per ciascuna specie. Porodko ha determinato i due punti estremi per alcuni batteri: riferiamone pochi esempi:

Specie	Massimo di O in atmosfere	Minimo di O in volume %
Bacterium butyricum . .	$\frac{1}{152}$	0
Bacterium cyanogenes. .	1.68-1.94	0.00016-0.06
Bacillus subtilis	3.18-3.88	0.00016
Bacterium coli	4.09-4.84	0

Che il passaggio dagli aerobi agli anaerobi sia graduale è provato, oltre che dalle ricerche di Chudiakow, anche da quelle di Fermi e Bassu, di Hesse, di Beijerinck e di altri.

Gli anaerobi dunque si distinguono dagli aerobi perchè la loro vita si può svolgere soltanto in un ambiente con minima tensione d'ossigeno; essi sono *microaerofili*, mentre gli aerobi sono *macroaerofili*. Bisogna però aggiungere che se gli anaerobi assoluti tollerano l'ossigeno, sia pure in minima quantità, è altresì vero che possono svilupparsi anche in assenza assoluta di esso, traendo in tal caso l'energia necessaria alle loro funzioni vitali non da processi di ossidazione ma da processi fermentativi.

Messa la questione sotto quest'aspetto, s'intende come nei terreni di coltura, secondo il metodo di Tarozzi, i pezzi di tessuto, avendo un'azione riducente, diminuiscono la tensione d'ossigeno a un punto compatibile con lo sviluppo degli anaerobi, se anche tal punto non rappresenti l'ottimo. Così non c'è forse bisogno di ammettere che la possibilità di questo sviluppo in ambienti non privati di ossigeno sia legata alla presenza di una speciale sostanza contenuta sia nei tessuti animali sia nei vegetali; ipotesi che del resto non arriva a dire in che modo la detta sostanza agirebbe.

Reazione.

La maggior parte dei batteri crescono bene in terreni con reazione neutra o leggermente alcalina: alcuni, come il vibrione del colera, prediligono una reazione più fortemente alcalina della ordinaria; altri possono moltiplicarsi anche bene in terreni con reazione leggermente acida, come il B. del tifo ed il B. della tubercolosi.

Per ogni specie batterica si possono ammettere tre punti cardinali di reazione: l'ottimo, il massimo, il minimo. Per illustrare questo fatto riferiamo un esempio di Kruse e Pansini. In sette tubi di agar fluidificato fu seminato ugual numero di pneumococchi, meglio diremo furono seminate uguali quantità di coltura, poi in tutti e sette fu messa della soluzione 10/N di soda caustica, in numero di gocce crescente, e se ne

fecero subito delle colture a piatto. Sviluppate le quali, furono contate le colonie, coi risultati seguenti:

Aggiunta di *NaOH* 10/N in gocce	0	8	16	24	32	40	48
Numero delle colonie . . .	0	2700	10200	∞	∞	13500	1800

In questa prova il minimo è rappresentato da 8 gocce, l'ottimo da 24-32, il massimo da 48 gocce di soluzione 10/N di soda.

La reazione del terreno di rado resta inalterata; via via che le colture crescono, essa cambia in un senso o nell'altro; e quando la reazione diviene troppo acida, già questo solo basta per impedire l'ulteriore sviluppo.

Umidità.

È anche questa una condizione essenziale allo sviluppo dei batteri. L'acqua di condensazione che nei terreni solidificati a becco di clarinetto si raccoglie al fondo giova a mantenere tale condizione per un tempo abbastanza lungo.

L'importanza che l'acqua contenuta nei terreni di coltura ha sullo sviluppo dei germi risulta evidente da questi dati di L. Wolf. In agar o gelatina col 70 % di acqua la moltiplicazione è per lo più rigogliosa; col 60 % comincia ad essere disturbata; col 50 % è per lo più meschina; col 40 % è ridotta a tale che ad occhio nudo non si scorge alcuna traccia di massa batterica. Le varie specie batteriche però si mostrano per questo rispetto diversamente sensibili.

Non bisogna confondere in tal proposito lo sviluppo dei germi con la loro conservazione in vita. Infatti, mentre quello ha una dipendenza così forte dall'acqua contenuta nei sostrati, la conservazione invece nei terreni anche inariditi può avere una durata maravigliosamente lunga: perfino dopo qualche anno seminando in brodo un residuo di coltura corrugata, di aspetto corneo, si può ottenere uno sviluppo rigoglioso.

E. — PROPRIETÀ BIOFISICHE.

Conveniamo d'intendere con questa denominazione quei fenomeni meccanici o fisici, che sono effetto diretto di funzioni vitali.

Movimento.

Molte specie batteriche sono dotate di una mobilità di traslazione più o meno rapida, dovuta al possesso della ciglia (v. p. 1360); altre specie, che non compiono veri e propri movimenti di traslazione, presentano

tuttavia movimenti di vibrazione, più o meno vivaci, per i quali possono bensì mutar posto, ma in termini assai ristretti, sicchè paiono quasi oscillare intorno ad un punto. Questi movimenti hanno spesso la forma del così detto movimento browniano, quale si osserva nelle minutissime particelle minerali, od in genere non organizzate, allorchè sono sospese in un liquido; ma in alcuni casi non si può escludere che dipendano, oltre che dalle condizioni fisiche proprie del movimento browniano, anche da una funzione vitale. Finalmente vi sono delle specie batteriche, piuttosto grosse, assolutamente immobili.

Si chiamano propriamente mobili solo i batteri che si trasferiscono, per tratti abbastanza lunghi, da un punto all'altro del campo microscopico, attraversandolo in tutti i sensi. La mobilità è funzione delle ciglia, ma non tutti i batteri ciliati sono mobili, stando all'asserzione di David Ellis, che avrebbe dimostrato le ciglia in micrococchi e streptococchi assolutamente immobili.

Le *forme del movimento* dei batteri sono varie: alcuni, come il *Bacillus subtilis,* si muovono torpidamente, avanzando con oscillazioni pendolari (movimento oscillatorio o pendolare); altri, come i vibrioni, si muovono procedendo come una trivella (movimento a succhiello); altri infine, come i bacilli del tifo, corrono in tutte le direzioni senza regola dimostrabile (movimento multiforme). In ogni caso, fra gl'individui che si muovono ve n'è sempre di quelli che stanno fermi, sia temporaneamente, sia per tutta la durata dell'osservazione.

L'intensità del movimento varia con la temperatura e, per gli anaerobi, con la tensione dell'ossigeno nel liquido in cui sono sospesi mentre si osservano; inoltre varia con la qualità del terreno di coltura, e con altre circostanze nelle quali sono state sviluppate le colture onde si è preparata la goccia pendente.

Per ciò che concerne le condizioni termiche dell'osservazione, le temperature troppo basse e le troppo alte impediscono il movimento, e la differenza fra la minima e la massima comportabile è più o meno grande, secondo le specie batteriche, e secondo gli stipiti di una stessa specie. La maggior parte dei batteri mobili si dimostrano tali anche se osservati a temperatura di stanza, cioè di 16-24° C; alcuni soltanto a 35-37°, la quale condizione si ottiene con le cassette e coi tavolini riscaldanti (v. p. 1155).

Per ciò che spetta alla temperatura di sviluppo, ricordiamo che colture di una medesima specie dimostrano individui mobili o immobili secondo che sono state sviluppate ad una od altra temperatura; e talora quella temperatura di sviluppo che li rende immobili finisce col privarli anche delle ciglia. Indipendentemente dalle condizioni termiche, non di rado sono stati osservati batteri mobili, che, dopo una lunga serie di trapianti in comuni terreni di coltura, hanno definitivamente perduto la mobilità e le ciglia; ciò è capitato, ad esempio, per il B. del tifo.

Fra le sostanze che, aggiunte ai terreni di coltura, pongono ostacolo allo sviluppo dei batteri mobili, sono per alcune specie il glicosio od altri zuccheri, per altre la glicerina, ecc.

L'influenza del terreno di coltura appare evidente già da questo esempio: seminando il *Bacterium coli* in gelatina a piatto, e da una delle colonie nate preparando una goccia pendente, non si vedono che forme immobili; basta allestire una coltura in agar o brodo, e farla sviluppare a 35-37°, perchè la mobilità propria del *Bacterium coli* si dimostri perfetta.

La *velocità del movimento* dei batteri è stata misurata per alcune specie, fra le quali nominiamo il bacillo del tetano che percorre 11 μ al secondo, quello del tifo che ne percorre 18, il vibrione del colera che ne fa 30.

Produzione di calore.

Con misure calorimetriche dirette si è riconosciuto che durante la loro moltiplicazione i batteri producono calore, e che nel terzo giorno le colture presentano un aumento massimo di temperatura, che va da 0.2 a 0.8° C., secondo le specie e secondo la qualità e ricchezza del sostrato nutritivo e le condizioni di sviluppo. Questa liberazione di calore sembra dovuta, più che all'accrescimento per sè stesso, alle trasformazioni chimiche del terreno.

Produzione di luce.

È noto come la fosforescenza, che talvolta si osserva nei pesci e nei pezzi di carne, sia dovuta a speciali batteri sparsi alla superficie, i quali diconsi per questa loro proprietà fotobatteri. Se ne conoscono circa una trentina, fra cui anche dei vibrioni. Vi sono per altro parecchie specie di ifomiceti che anche producono tale fenomeno. L'intensità luminosa dei fotobatteri è certamente assai piccola; ciò non ostante le colonie fosforescenti sono state più volte fotografate già nella propria luce soltanto.

Si ammette da qualcuno una ipotetica sostanza, detta fotogeno, che starebbe nel corpo batterico e diventerebbe luminosa in presenza dell'ossigeno libero.

F. — AZIONI BIOCHIMICHE DEI BATTERI.

I batteri, moltiplicandosi e utilizzando le sostanze nutritive che sono a loro disposizione, compiono delle trasformazioni chimiche svariatissime, i cui effetti sono palesi per la comparsa di composti nuovi, e non di rado per grossolane alterazioni dei terreni di coltura.

I nuovi composti che risultano sono quasi sempre assai più semplici delle sostanze originarie soggette all'azione batterica, quindi si tratta di fenomeni di scomposizione; ma non mancano esempi anche di fenomeni sintetici, per i quali da corpi relativamente semplici vengono formati corpi complessi.

All'opera trasformatrice dei batteri sono dovute le fermentazioni propriamente dette, la putrefazione e la corruzione delle sostanze organiche, la loro mineralizzazione, quindi la circolazione del carbonio e dell'azoto in natura.

Queste azioni importantissime furono distinte in due gruppi: quelle dovute all'attività biochimica diretta delle cellule batteriche e quelle dipendenti dagli enzimi che esse producono. Ma via via che si sono allargati ed approfonditi gli studi su questo argomento, un numero sempre maggiore delle azioni del primo gruppo si è dovuto riportare nel secondo: sicchè quella distinzione si è venuta attenuando. Pur conviene ancora mantenerla, e perciò diremo che le trasformazioni chimiche o sono opera dei batteri in quanto son vivi, cioè della loro attività biochimica diretta, oppure di enzimi, i quali sostanzialmente non differiscono da quelli degli organismi superiori vegetali ed animali. Distinguiamo dunque le trasformazioni biochimiche dalle enzimatiche.

Si può dire che non v'è sostanza organica che non possa essere attaccata dai batteri, sia pure da una sola o da pochissime specie di essi. Però quanto più complesse sono le sostanze, tanto minore è il numero delle specie batteriche capaci di trasformarle. Così, mentre poche sono le specie atte a demolire alcuni proteidi, più sono quelle che possono attaccare le proteine, come l'ovoalbumina, la sieroalbumina, la fibrina, ecc., e più ancora quelle che scompongono le albumose e i peptoni. Così pure, mentre poche specie sono in grado di scindere idrati di carbonio con alto peso molecolare, come l'amido, la destrina, ecc., assai più sono quelle che scindono gli zuccheri.

Vediamo quali sono i prodotti che possono derivare della loro azione, ordinandoli secondo la qualità delle sostanze da cui derivano.

Prodotti delle azioni biochimiche ed enzimatiche.

Dai proteici (principalmente albumine ed albuminoidi).

Si possono aggruppare come segue:

Proteosi: albumose e peptoni, che dànno alla lor volta i sottostanti corpi più semplici.

Composti della serie aromatica: fenolo, indolo, scatolo, triptofane o acido indolaminopropionico, acidi fenilacetico e fenilpropionico, tirosina e acido fenilaminopropionico, derivati piridinici.

Composti della serie alifatica: aminoacidi, come glicocolla, alanina, leucina, acido asparaginico; diaminoacidi, come ornitina, lisina.

Basi ammoniche: colina, neurina, neuridina, muscarina.

Amine: monometilamina, dimetilamina, trimetilamina; diamine, come etilendiamina, tetrametilendiamina o putrescina, pentametilendiamina o cadaverina.

Ammoniaca.

Composti di solfo: idrogeno solforato, mercaptano.

Dagli idrati di carbonio. Dalla scissione degli idrati di carbonio con alto peso molecolare, come amido, destrina, cellulosa, ecc., risultano in generale degli zuccheri; da questi, in ultimo, come da altri idrati più semplici, si hanno:

Acidi grassi: acido formico, acetico, butirrico, valerianico, capronico;

Ossiacidi: acido lattico, ossibutirrico;

Alcoli: alcool etilico, propilico;

Carbinoli: acetilmetilcarbinolo;

Metano;

CO_2, H_2O, H, O.

Dai grassi. Ne risultano glicerina ed acidi grassi, i quali possono subire alla lor volta ulteriori scissioni, con prodotti terminali simili a quelli indicati per gl'idrati di carbonio.

Dai glicosidi. Si scindono in glicosio, od altro zucchero, e composti organici vari secondo la natura dei glicosidi.

Il glicosio, o generalmente la qualità di zucchero che ne risulta, può andare incontro alle sorti già dette; gli altri composti anch'essi possono essere ulteriormente trasformati.

I corpi organici semplici che provengono dalla scomposizione di sostanze complesse, come anche altri composti vari, che non sono stati ricordati, perchè non appartengono a nessuno dei gruppi precedenti (per esempio, l'urea ed i corpi purinici), possono essere alla loro volta demoliti, con produzione terminale di H_2O, H, O, NH_3, H_2S, senza dire della eventuale comparsa di acido fosforico, derivante dalla demolizione di sostanze fosforate, e di altri corpi inorganici speciali, come composti di ferro, di arsenico, ecc.

L'ammoniaca e l'acido solfidrico possono essere poi mineralizzati, come vedremo.

Cenno sugli enzimi batterici.

Abbiamo detto che le trasformazioni chimiche sono prodotte in generale da enzimi, sostanze cioè capaci di agire indipendentemente dalla vita dei batteri che li producono. Di una buona parte di essi è stata data la dimostrazione; degli altri non ancora, ma se ne presume l'esistenza per ragioni d'analogia.

Gli enzimi prodotti dai batteri possono essere segregati ed eliminati nel mezzo in cui vivono, o anche essere ritenuti nel loro corpo: si distinguono perciò in *esoenzimi*, che si possono separare per filtrazione dai rispettivi corpi batterici, ed *endoenzimi*, che si possono in alcuni casi estrarre con artifizi tecnici, per esempio con la spremitura.

Ve ne sono però alcuni, che fino ad ora non si sono potuti estrarre, e tuttavia esistono, poichè le rispettive cellule batteriche anche morte, purchè non disfatte, sono ancora capaci di produrre le trasformazioni specifiche. Si ha ragione di credere che, escogitando nuovi metodi, si riescirà ad ottenere anche questi enzimi, la cui azione si perde appena siano scompaginati i corpi batterici che li contengono. Gli enzimi di questo tipo furono già detti « fermenti figurati od organizzati » e contrapposti ai « fermenti non organizzati » o enzimi in senso stretto: tale distinzione terminologica è oramai quasi caduta in disuso.

Non si conosce nulla di preciso circa la natura chimica degli enzimi, poichè nei tentativi fatti per isolarli e sottoporli ad analisi, non si è mai certi di averli allo stato di purezza. Dell'amilasi alcuni hanno asserito la natura di albumosa o simile, altri di nucleoproteide. Per altri enzimi Nencki e Sieber ammettono che si tratti di molecole gigantesche, contenenti lecitina, ferro, fosforo e cloro in istato di combinazione, e provviste di molteplici catene o gruppi laterali: sarebbero come grossi frammenti di protoplasma. La coagulasi che agisce sul latte è, secondo Scala, una sostanza proteica del tipo dei peptoni, di carattere debolmente basico, per la presenza di aminogruppi. Certo pare fino ad ora solo questo, che sono sostanze allo stato colloidale.

La maggior parte degli enzimi sono solubili in acqua o in deboli soluzioni saline, dalle quali, almeno in parte, possono venir precipitati, similmente alle proteine, mediante l'alcool, il solfato d'ammonio e di magnesio, il bicloruro di mercurio, il cloruro di sodio, l'acetato di piombo o di rame o di uranile, il fosfato di calcio o di uranile, l'acido fosfotungstico o fosfovolframico, l'acido picrico ecc., aggiunti in convenienti concentrazioni. Vi sono parecchi enzimi solubili anche in glicerina.

Quasi tutti gli enzimi solubili filtrano attraverso candele di porcellana; alcuni dializzano più o meno difficilmente secondo la qualità della membrana dializzatrice, secondo la presenza di altre sostanze e secondo il vario grado dello stato colloidale della loro soluzione.

Gli enzimi in soluzione divengono spesso inattivi per un breve riscaldamento a 60-70° C.; precipitati ed essiccati resistono a temperature di parecchio superiori.

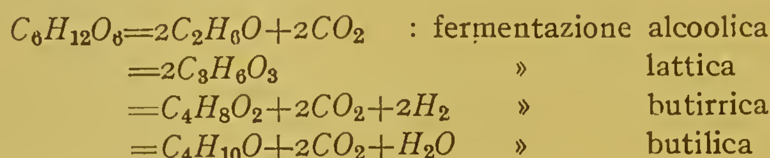
Ai veleni protoplasmatici, come fenolo, acido salicilico, cloroformio, gli enzimi resistono più che le rispettive cellule batteriche: è perciò differenza di grado.

L'argomento del modo d'azione degli enzimi è troppo intricato da potere essere esposto nel breve spazio consentito dall'indole di questo manuale. Di necessità ne tocchiamo solo qualche punto in forma sommaria.

Gli enzimi hanno azione specifica, cioè ciascuno di essi può attaccare solo sostanze di una determinata struttura molecolare e stereochimica, dando sempre gli stessi prodotti; diversi enzimi atti a scomporre una medesima sostanza si distinguono per la diversità dei corpi che ne producono. Diamo un esempio, il quale propriamente non si riferisce agli

enzimi, ma ai batteri vivi che li contengono; però l'esempio è valevole, per le ragioni sopra esposte.

Il glicosio può essere attaccato dal saccaromiceta del mosto (1), dal Bacillo dell'acido lattico, da vari bacilli butirrici, dal *Granulobacter amylicum* di Beijerinck. Rispettivamente ne risulta, insieme con prodotti secondari, alcool etilico, acido lattico, acido butirrico, alcool butilico, secondo le seguenti equazioni:



$$C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_6O + 2CO_2 \quad \text{: fermentazione alcoolica}$$
$$= 2C_3H_6O_3 \quad \text{» lattica}$$
$$= C_4H_8O_2 + 2CO_2 + 2H_2 \quad \text{» butirrica}$$
$$= C_4H_{10}O + 2CO_2 + H_2O \quad \text{» butilica}$$

Gli enzimi in quantità piccolissime agiscono su quantità relativamente grandi di sostanza fermentescibile, e non fanno mai parte dei prodotti terminali della fermentazione, alla fine della quale essi trovansi intatti come prima.

La temperatura e la reazione del mezzo hanno grande influenza sulle azioni enzimatiche. La temperatura ottima varia per i diversi enzimi, in generale è compresa fra 35 e 50° C. La reazione del mezzo dev'essere leggermente acida per alcuni, come l'amilasi; alcalina per altri, come la tripsina.

L'azione degli enzimi sulle varie sostanze organiche somiglia a quella che dimostrano le soluzioni colloidali di platino e di oro sull'acqua ossigenata, scomponendola in acqua ed ossigeno libero. Lo studio di questa reazione, che è anche prodotta da molti batteri, ha messo in luce che i metalli colloidali agiscono per contatto, accelerando il processo di scomposizione, che in minimo grado già è iniziato per sè stesso, sono cioè dei catalizzatori; nelle fermentazioni gli enzimi avrebbero appunto la parte di catalizzatori. Sicchè, seguendo questo concetto, che è di Ostwald, i processi fermentativi altro non sono che reazioni chimiche, le quali si iniziano già per sè stesse, ma si svolgerebbero con grandissima lentezza, senza effetti ben evidenti, se non fossero accelerate dagli enzimi: solo per opera di questi i processi compionsi rapidi ed intensi, ed acquistano importanza pratica.

Per ciò che concerne il meccanismo d'azione del presame, Scala ha emesso un'ipotesi, che può essere valevole altresì per la tripsina e l'amilasi. Tanto il presame quanto la caseina trovansi allo stato colloidale. La caseina può immaginarsi come risultante dall'azione di un sale di calcio sopra un colloide originario ipotetico, la cui micella è attorniata da un numero indeterminato di molecole d'acqua ionizzate: la caseina è infatti un caseinato di calcio. A sua volta il presame può essere considerato come derivante dall'azione di un acido sopra un colloide origi-

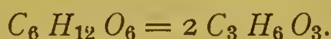
(1) Ci sia consentito un esempio tratto da un gruppo di microrganismi differente da quello dei batteri.

nario ipotetico, avente pur esso la micella attorniata da molecole d'acqua ionizzate; il presame infatti è attivo e conservabile solo quando è salificato. L'inizio della reazione enzimatica è rappresentato dall'unione del presame e della caseina, con eliminazione di un sale di calcio; ma il composto presame-caseina, dato da un acido e da una base debolissimi, va incontro alla dissociazione idrolitica, onde nasce l'acido caseinico, destinato a formare il coagulo, e si ripristina il presame libero. Questo però, per la sua conservazione, ha bisogno di salificarsi, il che può fare togliendo alla caseina già trasformata il residuo acido minerale già abbandonato dal calcio; in tal modo il presame diventa attivo e capace di ricominciare la sua azione e di ripeterla in maniera ciclica indefinitamente.

Considerando il meccanismo delle reazioni enzimatiche sotto un altro aspetto, possiamo dire che esse possono compiersi con o senza la partecipazione di acqua o di ossigeno. Si distinguono perciò processi di *semplice scissione*, in cui la sostanza si scompone senza che, almeno in apparenza, vi partecipi alcun elemento estraneo; processi di *ossidazione*, nei quali la sostanza prima di essere trasformata viene ossidata; processi di *idrolisi*, in cui viene prima idratata; processi di *riduzionè*, in cui la sostanza viene semplicemente ridotta; processi di *eterificazione*, nei quali essa è privata di una o più molecole di acqua.

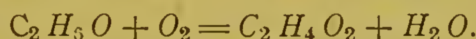
Esempi:

Una semplice scissione è la fermentazione lattica del glicosio:



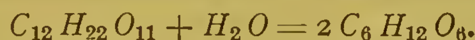
$$C_6 H_{12} O_6 = 2 C_3 H_6 O_3.$$

Un processo d'ossidazione è la trasformazione dell'alcool in aceto:



$$C_2 H_5 O + O_2 = C_2 H_4 O_2 + H_2 O.$$

Un processo d'idrolisi è l'inversione del saccarosio:



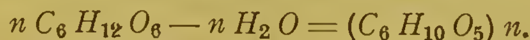
$$C_{12} H_{22} O_{11} + H_2 O = 2 C_6 H_{12} O_6.$$

Un processo di riduzione è la trasformazione dei nitrati in nitriti:



$$HNO^3 = HNO^2 + O.$$

Un processo di eterificazione è quello per cui gli esosi (zuccheri con 6 atomi di carbonio) presenti nel vino, nella birra, nel latte, nel succo di barbabietole, ecc., possono venire condensati in polisaccaridi, con produzione di sostanza mucilagginosa filante, secondo la formula generale:



$$n C_6 H_{12} O_6 - n H_2 O = (C_6 H_{10} O_5) n.$$

Principali enzimi ed azioni biochimiche ed enzimatiche.

Enzimi proteolitici o proteasi. Questi enzimi batterici hanno caratteri per cui somigliano alla tripsina.

Un buon numero di batteri fluidifica la gelatina, com'è noto. Tale fenomeno è prodotto da un enzima: infatti il Fermi dimostrò per il *Bacillus*

anthracis, il *Vibrio cholerae*, il *Bact. pyocyaneum* e parecchi altri che, escludendo l'azione vitale dei germi sia col riscaldamento a 57-60°, sia con sublimato, fenolo od acido salicilico, sia filtrando le brodocolture attraverso candela di porcellana, la fluidificazione si produce lo stesso.

Vi sono inoltre alcuni germi, che, sempre per mezzo di enzimi, sciolgono la fibrina o il siero di sangue coagulato, altri la caseina, sia o pur no precedentemente coagulata.

Lipasi. Molti batteri sono capaci di scindere i grassi, per idrolisi, in glicerina ed acidi grassi: la prova però che essi facciano tale scomposizione per mezzo di enzimi è stata data solo per qualcuna delle specie, come il bacillo della tubercolosi e quello del carbonchio. Ma si suppone che anche ad enzimi sia dovuta l'azione lipolitica che dimostrano lo stafilococco aureo, il vibrione del colera, il *Bact. pyocyaneum*, il *Bact. fluorescens liquefaciens* ed il *Bact. fluor. non liquefaciens*, il *Bact. prodigiosum* e tanti altri.

Glicosidasi. Fermi e Montesano riscontrarono la proprietà di scindere l'amigdalina solo in alcuni stipiti di *Bacterium coli* e di *Vibrio metschnikowi*. Anche qualche specie di attinomiceti può scindere l'amigdalina.

Twort provò rispetto ad un gran numero di glicosidi il comportamento dei germi appartenenti al gruppo del *Bacterium coli* e vide che questi più frequentemente attaccano alcuni glicosidi, come, ad esempio, l'iridina; meno frequentemente la salicina, l'arbutina ed altri; raramente l'amigdalina e la saponina; mai la ciclamina, la convolvulina, ecc.

L'indicano viene scisso dal *Bact. coli*, dal *Bact. pneumoniae*, dal *Bact. prodigiosum* e da altri.

In nessuno di questi germi studiati si è però potuta dimostrare la esistenza di enzimi, cioè di glicosidasi; anzi per l'indicano Beijerinck afferma che la scomposizione è un processo catabolico direttamente legato alla vita dei batteri.

Enzimi diastatici o diastasi. Parecchi batteri hanno il potere di sciogliere e scindere l'amido in destrina e maltosio; così il *Bacillus anthracis*, il *Bac. subtilis*, il *Bac. butyricus* ed altri. Fermi ha dimostrato che la trasformazione si compie per mezzo di una diastasi solubile, detta anche amilasi.

Similmente la destrina può essere ulteriormente trasformata in maltosio da vari batteri, pei quali si suppone, non però è sicuramente dimostrata, la presenza di un enzima, la destrinasi.

Pochi batteri hanno la proprietà d' invertire il saccarosio, il che fanno per mezzo dell'enzima invertina o invertasi: così il *Bacterium vulgare*, il *Bact. fluorescens liquefaciens*, il *Bacillus megatherium* e qualche altro.

In generale però i disaccaridi, come il maltosio, il lattosio, il saccarosio stesso ed altri, sono per lo più trasformati dai germi direttamente in acidi grassi e prodotti secondari.

Il glicosio, il galattosio, il fruttosio ed altri esosi, come anche l'arabinosio, lo xilosio ed altri pentosi, e gli alcoli polivalenti, come la man-

nite, la xilite, ecc., possono dai batteri essere variamente scissi, per lo più con produzione di acidi.

Anche la glicerina può essere decomposta con produzione di acidi.

Nei batteri non è però ancora dimostrato che le dette scissioni degli esosi e pentosi e della glicerina dipendano dall'esistenza di enzimi.

Coagulasi. Molti batteri coagulano il latte, lasciandone quasi inalterata la reazione. Il fenomeno è dovuto ad un enzima simile al presame o chimosina. Non bisogna confondere la coagulazione del latte enzimatica con quella prodotta dalla reazione acida, conseguente alla decomposizione del lattosio.

Altri enzimi attivi su composti organici semplici. Ricordiamone qualcuno.

L'acido urico può essere da alcuni batteri variamente scomposto per idrolisi, o per idrolisi ed ossidazione. Dagli escrementi dei polli Ulpiani isolò un bacillo che dall'acido urico forma urea con produzione di CO_2, senza però esser capace di trasformare anche l'urea. L'azione combinata di due o più specie, delle quali una attacchi l'acido urico, l'altra i primi termini della sua scomposizione, finisce col demolirlo in CO_2 e carbonato d'ammonio, ossia, in ultima analisi, in CO_2 e NH_3. Fra i prodotti intermedi c'è sempre l'urea, ed insieme con essa ora l'allossano ora l'acido tartronico.

Alcuni batteri possono analogamente scindere la caffeina, la teobromina.

Altri composti purinici soggiacciono all'azione batterica. Ulpiani e Cingolani ottennero dalle feci dei piccioni un batterio atto a scomporre la guanina in urea, guanidina e CO_2. La guanidina alla sua volta può essere trasformata da altri batteri in urea, e questa da altri ancora in carbonato d'ammonio. La guanina può essere anche trasformata in xantina, similmente l'adenina in ipoxantina.

Si suppone che questi fenomeni siano di natura enzimatica.

L'urea può essere attaccata vivacemente da parecchi batteri, che complessivamente diconsi urobatteri; dei quali si nominano il *Bact. ureae*, il *Micrococcus ureae* ed altri fra cui quelli distinti da Miquel e da Beijerinck coi nomi *Urococcus, Urosarcina, Urobacillus:* del resto anche i protei, il *Bacillus putrificus coli*, il *Bac. perfringens*, gli stafilococchi.

L'urea per idrolisi vien trasformata in carbonato d'ammonio:



$$CO\,(NH_2)_2 + 2\; H_2O = (NH_4)_2\; CO_3.$$

Da alcuni batteri che fermentano l'urea è stato isolato un enzima specifico, l'ureasi.

Enzimi che sono causa di formazione e trasformazione di sali. Importanti sono i processi di nitrificazione e denitrificazione. Il primo di questi due fenomeni ha una grande importanza pratica in agricoltura: per esso l'ammoniaca risultante dalle varie scomposizioni dei corpi azotati viene ad essere trasformata in nitriti e nitrati, dai quali le piante pos-

sono quindi ricavare l'azoto necessario ai loro processi di sintesi chimica: così l'azoto delle sostanze proteiche decomposte e mineralizzate per l'opera demolitrice dei batteri, torna a far parte dei nuovi composti azotati e proteici per l'opera ricostruttiva delle piante. Si chiamano nitrosanti e nitrificanti i batteri che compiono l'ossidazione dell'ammoniaca in acido nitroso o nitrico.

Un ricordo a parte meritano i così detti batteri radicicoli, che assimilano l'azoto atmosferico, ed accumulandosi nelle radici delle leguminose, vi formano i tubercoli radicolari, che costituiscono una forte riserva utilizzabile di materia azotata. I batteri si alterano, presentando rigonfiamenti terminali e biforcazioni, si vacuolizzano e finalmente si dissolvono, offrendo così il pabulo alla pianta ospite. Questi batteri sono coltivabili artificialmente; ma le colture ottenute da parecchi autori e dichiarate di *Bact. radicicola* appartengono, secondo De Rossi, a germi simili, ma incapaci di dar luogo a tubercoli nelle esperienze d'infezione. A questo autore per la prima volta riuscì di ottenere in coltura pura un vero *Bact. radicicola*, atto a riprodurre i tubercoli radicali negli esperimenti di coltivazione in terreni previamente sterilizzati. Vi sono per altro più specie batteriche capaci degli stessi effetti, specialmente quando operano in simbiosi; così il *Clostridium pasteurianum* di Winogradsky e l'*Azotobacter chroococcum* di Beijerinck.

All'opera utile di questi batteri si contrappone quella di altri che riducendo i nitrati in nitriti, e questi a sua volta in ammoniaca, finiscono con rendere libero l'azoto elementare: diconsi rispettivamente denitrificanti ed ammonizzanti.

Tali trasformazioni sono in parte dimostrate, in parte fondatamente supposte, di natura enzimatica.

Maggiori particolari su quest'argomento si tralasciano, perchè ricordati altrove in questo Manuale (vol. II, p. 353). Per la stessa ragione si sorvola sull'ossidazione dell'idrogeno solforato con liberazione di solfo elementare e produzione di acido solforico, e per gl'inversi processi di riduzione; come anche sulle trasformazioni di alcuni composti ossigenati del ferro, per le quali si rimanda anche al capitolo dei Batteri filamentosi.

Un processo di riduzione che i microrganismi compiono, si può dire universalmente, è quello messo in evidenza da Gosio. I telluriti e i seleniti alcalini vengono ridotti con formazione di tellurio e di selenio elementare; questo fenomeno è dimostrabile, oltre che microscopicamente, anche ad occhio nudo, per la comparsa di un precipitato rispettivamente nero o rosso nei liquidi in cui si svolge il fenomeno. Questo è essenzialmente legato alla vita dei batteri: i corpi morti non li producono, o ciò fanno alcuni germi e con tanta lentezza ed in così minimo grado da non avere alcuna importanza. I corpi batterici che operano la riduzione si pigmentano con le particelle di tellurio o di selenio: Gosio ha visto che i patogeni risultano per conseguenza di questo fatto notevolmente attenuati nella loro virulenza, il che può spiegare i risultati ottenuti re-

centemente da Wassermann con l'eosinselenio nella cura dei tumori dei topi.

La presenza di glicosio aggiunto nella proporzione di 0.5-1 $^{0}/_{0}$ favorisce la riduzione; la presenza di antisettici la impedisce. Il tellurito potassico in soluzioni 1: 100,000 - 1: 200,000 vien ridotto sempre in maniera evidente, e non ha negli animali e nell'uomo la benchè minima azione tossica.

Atteso il carattere generale dell'azione riducente dei batteri e le proprietà accennate, Gosio propose di utilizzarla, e Giorgi studiò i particolari dell'applicazione, per rivelare l'eventuale inquinamento dei vaccini e dei sieri terapeutici, potendo bastare per la comparsa del fenomeno le dette quantità minime di tellurito potassico, attive ed innocue.

Pigmenti batterici.

Parecchi batteri producono pigmenti di vario colore, la cui natura chimica non è ancora ben conosciuta.

I *pigmenti gialli, arancio, rosa* appartengono al tipo della carotina; sono affini ai lipocromi, insolubili in acqua, solubili in alcool, etere, cloroformio, benzolo, solfuro di carbonio. Trattati con acido solforico concentrato diventano verdazzurri, con soluzioni alcaline mutano poco di colore.

La *prodigiosina*, pigmento cremisino del *Bacterium prodigiosum*, solubile in alcool ed in etere, trascolora in giallo con gli alcali, in rosa violetto con gli acidi, è ridotto dall'idrogeno nascente.

La *iantina*, pigmento viola del *Bacterium violaceum*, solubile in alcool, non in etere, benzolo, cloroformio; trattata con acidi o con alcali, diventa verde o verdazzurra; vien ridotta dall'idrogeno nascente.

La *sincianina* del *Bacterium syncyaneum*, di colore bruno turchiniccio, insolubile del tutto, trascolora con liscivia sodica in giallo-rosa, poi col tempo diviene rosso-bruna.

La *piocianina*, del *Bacterium pyocyaneum*, di color verde, solubilissima in cloroformio, che si colora di un bel verdazzurro.

La *batteriofluoresceina*, di colore verdognolo, causa della fluorescenza di alcuni batteri, solubile in acqua ed in alcool allungato, non in alcool forte, nè in etere, nè in solfuro di carbonio, nè in cloroformio. Per mezzo di quest'ultimo reattivo si può separare la piocianina dalla batteriofluoresceina nelle colture del *Bacterium pyocyaneum*, che possiede tutt'e due i pigmenti.

Tutti i batteri produttori di pigmenti diconsi *cromogeni*, e si distinguono in *cromofori*, quelli che ritengono il pigmento nel loro corpo, *paracromofori* quelli che lo mostrano accumulato alla loro superficie, *cromopari* quelli che lo eliminano diffondendolo nel terreno di coltura.

G. — COMPORTAMENTO DEI BATTERI RISPETTO AGLI AGENTI FISICI E CHIMICI.

Calore.

Le basse temperature non nuocciono ai batteri, i quali sopportano fino a 180°-190° sotto zero, senza mostrarsi per questo meno vitali di prima. Soltanto l'assoggettamento a variazioni brusche di temperatura, cioè il gelo e disgelo, può danneggiarli ed ucciderli.

Le temperature alte invece hanno azione battericida, massime in presenza di vapor d'acqua.

Quasi tutte le forme vegetative dei batteri patogeni periscono in ambiente umido già dopo un riscaldamento a 55°-60° C. per 10-20′, a 70° per 5′, a 80° per minor tempo ancora.

Per avere un'idea del valore generale di questa asserzione si dia uno sguardo al seguente specchietto, nel quale accanto al nome del germe è indicata la temperatura alla quale il calore lo distrugge dopo 10′.

Micrococcus pyogenes	54° C.
» *gonorrhoeae*	55°-60°
Streptococcus pyogenes	54°
» *lanceolatus*	56°
Bacterium typhi	56°-60°
» *coli*	58°-60°
» *dysenteriae*	58°-60°
» *pyocyaneum*	56°
» *prodigiosum*	58°
» *murisepticum*	58°
» *rhusiopathiae*	58°
» *diphtheriae*	60°
» *mallei*	55°
» *tuberculosis*	60°-65°
Bacillus anthracis (forme vegetative)	54°
Vibrio cholerae	52°-58°

Facendo invece agire il calore secco alle stesse temperature, gli elencati germi sono ancora vitali, secondo Casagrandi, dopo 40′.

Alla temperatura di 70° restano uccisi dopo 5′ i seguenti:

Micrococcus pyogenes, Streptococcus pyogenes, Bacterium typhi, Bact. cholerae gallinarum, Bact. murisepticum, Bact. rhusiopathiae, Bact. tuberculosis, Bacillus anthracis (forme vegetative).

Bisogna però avvertire che piccole differenze sono state osservate dai vari autori, e possono sempre osservarsi, circa la temperatura e la durata d'azione del calore, secondo gli stipiti di una stessa specie, che mostrano diverso grado di resistenza.

Le spore si mantengono vitali a temperatura di parecchio più alta e per una durata d'azione maggiore. Le differenze di comportamento fra spore e spore non solo si verificano per le diverse specie, ma anche per i diversi stipiti di una specie medesima, in misura assai maggiore che non accada per le forme vegetative.

Le spore sopportano senza danno l'azione del vapore a 100° per parecchi minuti; ve n'è di quelle che si dimostrano capaci di germogliare anche dopo 4-6 e più ore di tale azione. In generale però muoiono dopo che sono esposte per un'ora al vapore a 115°, dopo pochi minuti a 130°. Il calore secco invece, per distruggerle, ha bisogno di agire almeno un'ora a 180°.

Per dare un esempio concreto, riportiamo i seguenti dati ottenuti dal Christen per un esemplare di spore:

Azione del calore umido a		Spore morte dopo
100° C.	. . . .	16 ore
105-110	. . . .	3-4 ore
115	. . . .	30-60 minuti
120	. . . .	5-15 minuti
125-130	. . . .	5 minuti
140	. . . .	1 minuto.

Non ci dilunghiamo in questo argomento, che è trattato ampiamente, con riguardo alla pratica delle disinfezioni, nel Volume II (pp. 851 e seg.).

Essiccamento.

I batteri naturalmente possono soccombere per mancanza di nutrizione, e poichè questa non può farsi che in ambiente umido, si comprende come l'essiccamento a poco a poco li conduca a morte. La resistenza all'essiccamento varia moltissimo per le diverse specie. Così mentre il bacillo della tubercolosi può sopportarlo fino a mezz'anno circa, ed il bacillo della difterite e quello del tifo per alcune settimane, il vibrione del colera invece muore già dopo 3-4 ore.

Le spore invece allo stato secco rimangono intatte nella loro virtù germinativa anche dopo molti anni, fino a 10: tali sono quelle dei bacilli del carbonchio e del tetano e di altri.

Permanenza nell'acqua, nel suolo ed in sostanze liquide o solide ricche di acqua.

Nell'acqua i batteri si conservano più o meno a lungo, secondo che vi trovano condizioni propizie o sfavorevoli. Naturalmente vi è per questo rispetto gran differenza fra l'acqua distillata pura e sterilizzata, le acque contenenti dei sali sterilizzate, quelle contenenti anche tracce di ma-

terie nutritive e le acque naturali, limpide o luride, che, oltre a tutto il resto, possiedono una propria flora batterica: queste diverse condizioni influiscono in varia misura sulla persistenza di una data forma batterica. Per esempio nell'acqua di fiume il Koch trovò il vibrione del colera vivente anche dopo 3-4 settimane, e nell'acqua di una cisterna Hankin ne potè dimostrare la presenza dopo 11 mesi; Hoffmann riscontrò in un acquario il B. del tifo anche dopo un anno; e Conradi asserisce che il *Bact. typhi*, il *Bact. coli*, lo stafilococco, il B. del carbonchio vivono meglio nell'acqua di conduttura che nella sterilizzata. Altri invece, come Mac Naught per il B. nel tifo nelle acque cloacali, Vincent per il B. della dissenteria nelle acque potabili, asseriscono l'influenza nociva degli altri germi, saprofiti, che vi si trovano insieme.

Levi della Vida riconobbe che il B. del tifo, il quale nell'acqua distillata si conserva vitale per oltre 10 giorni, perisce per lo più interamente dopo 2 3 giorni in soluzioni di *NaCl* al 0.45-0.90-1.80 %; laddove il V. del colera, che in pochissime ore soccombe in acqua distillata, sopravvive in soluzione di *NaCl* al 0.90 % fino a 26 giorni.

Similmente nel terreno umido, nelle feci, nelle derrate alimentari, come latte, carne, pesce, ecc. la resistenza di una data specie è più che altro determinata dalla possibilità di nutrizione e dalla concorrenza vitale di altri microrganismi.

Per i particolari di questo argomento, vedi nel Vol. II, pp. 784 e seg.

Luce.

La luce diffusa non ha alcuna azione sensibile sulla vitalità dei batteri. Soltanto la luce solare diretta è battericida e sporicida. L'azione battericida della luce fu dimostrata elegantemente dal Buchner (vedi pag. 1285). Naturalmente vi sono differenze fra specie e specie, e per una stessa specie hanno influenza le condizioni d'esperimento. I piogeni, il vibrione del colera, il bacillo del tifo ed altri, esposti alla luce solare, muoiono in brevissimo tempo, mentre il bacillo della difterite si dimostra più resistente: infatti sospeso in acqua distillata muore solo dopo 2-8 ore di intensa insolazione. Se però dello stesso bacillo della difterite si espongono delle agarcolture, esso rimane vivo ancora dopo 4-5 giornate; se delle brodocolture, vi si può moltiplicare perfino. Il *Bact. prodigiosum*, in colture di 3 ore, si mostra 5-6 volte meno resistente che in quelle di 10-12 ore.

Offre un certo interesse il fatto che le spore del bacillo del carbonchio possono già essere morte dopo 2 ore d'insolazione, non dimostrando rispetto alle sue forme vegetative quella molto maggior resistenza che invece offrono rispetto ad altri agenti nocivi.

L'azione battericida della luce solare è indipendente dal calore che l'accompagna, poichè rimane la stessa anche se la luce è fatta prima passare attraverso uno spesso strato d'acqua o di una soluzione di al-

lume. I raggi attivi sono gli ultravioletti ed i violetti, quindi i più refrangibili, meno attivi sono gli azzurri ed i verdi, quasi per nulla i gialli ed i rossi.

I batteri mobili esposti alla luce diretta, che li può danneggiare, cercano di portarsi nei punti meno colpiti, vale a dire presentano una *fototassi negativa*. Al contrario, i così detti batteri purpurei, che possiedono un pigmento assimilatore, vanno incontro alla luce, perciò dimostrano una *fototassi positiva*.

Raggi Röntgen.

Con un espediente analogo a quello escogitato da Buchner per dimostrare l'azione battericida della luce (vedi pag. 1285), il Rieder fece delle esperienze esponendo, a 10 cm. di distanza dall'anticatode, le piastre seminate con vibrione del colera, con bacillo del tifo ecc., tutte coperte di carta nera per eliminare l'azione della luce, e di una lamina di piombo intagliata per escludere in alcuni tratti anche l'azione dei raggi speciali. Le piastre poi furono tenute in termostato, e, passato un tempo conveniente, fu visto che nei tratti irradiati il numero delle colonie era assai minore che negli altri. L'azione antibatterica dei raggi Röntgen è quindi abbastanza debole.

Elettricità.

Le forti correnti elettriche uccidono i batteri; ma correnti continue di 0.2-0.3 ampère/cmq. e 68 volta, correnti alternate di 0.5 ampère/cmq. e 110 volta, anche per la durata di molte ore, non hanno alcuna azione battericida nè attenuatrice.

Facendo passare una corrente continua per una sospensione di batteri mobili, questi si portano al catode, quindi presentano un fenomeno di *galvanotassi*.

Pressione.

Le pressioni anche fortissime di 500-1000 atmosfere non danneggiano i batteri, nè alterano alcuna delle loro proprietà. Certes provò che i bacilli della putrefazione, rimanendo sotto una pressione di 300-500 atmosfere, possono continuare indisturbati i loro processi vitali. Una pressione di 2000-3000 atmosfere mantenuta per 24 ore riesce di qualche nocumento, ma solo ad alcune specie batteriche.

Scotimento.

Questo ed altri movimenti meccanici possono avere influenza sulla vita di alcuni batteri. Per alcune specie un lieve scotimento riesce favorevole, uno più forte dannoso; per altre specie è già nociva una lieve prolungata trepidazione, quale può essere trasmessa al terreno di col-

tura da forti onde sonore; per altre infine, come il B. del tifo ed il V. del colera riesce indifferente lo scotimento anche prolungato (Levi della Vida). Gli effetti sono inoltre diversi secondo che i movimenti sono impressi alle colture stesse o a liquidi di varia composizione in cui si trovano sospesi i batteri.

Sostanze chimiche.

Bisogna distinguere le sostanze gassose, le sostanze liquide e le soluzioni.

Fra i corpi gassosi, l'anidride solforosa ha una debole azione battericida. La formaldeide invece, purchè agisca a temperatura piuttosto elevata ed in presenza di vapor d'acqua, uccide in breve tempo la maggior parte delle forme vegetative (v. Volume II, p. 845).

I vapori di alcune sostanze, come aldeidi, alcoli, essenze, hanno pure un'azione dannosa sulla vita dei batteri, principalmente delle forme vegetative: il potere disinfettante dei vapori degli alcoli monobasici e delle aldeidi è tanto più forte quanto maggiore è la loro volatilità, ossia quanto minore è la grandezza della loro molecola (Levi della Vida).

Maggiore importanza hanno le soluzioni di vari corpi, che sono principalmente gli alcali, gli acidi, i sali, la formaldeide, alcuni composti aromatici, i colori d'anilina. L'azione antibatterica delle soluzioni può essere di vario grado, secondo la concentrazione loro, e secondo la temperatura e la durata d'azione: esse cioè possono o uccidere le forme vegetative ed anche le spore, e parlasi allora, conforme alla nomenclatura di Hueppe, di azione sporicida o disinfettante propriamente detta; o solo uccidono le forme vegetative, nel qual caso dicesi che l'azione è battericida o antisettica; o ne impediscono lo sviluppo, senza ucciderle, e l'azione chiamasi allora asettica; o finalmente possono soltanto attenuare o togliere loro ogni proprietà patogena, ed hanno allora un'azione attenuativa.

Però non è a credere che vi siano dei rapporti regolari fra il potere sporicida e battericida e asettico di una medesima sostanza: basti ricordare, per esempio, che l'acqua di cloro o di bromo è sporicida, ma ha relativamente poca virtù asettica, assai minore del verde di malachite, mentre questo ha una grande efficacia asettica e niuna sporicida.

Le proprietà antibatteriche delle soluzioni in genere sono talora in relazione con la natura chimica e le condizioni fisico-chimiche della sostanza disciolta. Come esempio per chiarire questa affermazione, scegliamo le soluzioni di $HgCl_2$. Paul e Krönig hanno dimostrato che il potere antibatterico delle soluzioni di sublimato è in rapporto con la loro concentrazione e col rispettivo grado di dissociazione (v. p. 111), più precisamente con la quantità di ioni *Hg* presenti nella soluzione.

Che sia in rapporto con la concentrazione, appare dal seguente quadretto, indicante la durata d'azione di varie soluzioni sulle spore del *Bac. anthracis* alla temperatura di 18° C.

Soluzione	1.7 %	morte dopo	12-14 minuti
»	0.84 »	»	24-30 »
»	0.42 »	»	45-60 »
»	0.22 »	»	60-80 »
»	0.11 »	»	oltre due ore.

Che stia in rapporto col grado di dissociazione, risulta dai seguenti dati degli stessi autori, i quali in una soluzione di sublimato ad 1.7 % condisciolsero quantità crescenti di *NaCl*, la cui aggiunta in concentrazioni via via maggiori ha per effetto di sempre più abbassare il grado di dissociazione. Essi dunque, avendo fatto agire per 6 minuti la soluzione di sublimato solo, e d'altra parte le soluzioni contenenti anche *NaCl*, sulle spore del *Bac. anthracis*, allestirono colture a piatto, e dopo il tempo dovuto contarono il numero delle colonie superstiti, che furono:

per la soluzione di $HgCl_2$	1.7 %	sola	. . . .	8
»	»	»	+ $NaCl$ 0.37 %	32
»	»	»	+ » 0.74 »	124
»	»	»	+ » 1.48 »	382
»	»	»	+ » 2.2 »	803
»	»	»	+ » 3.7 »	1087

Non ostante questa influenza che il *NaCl* ha sul grado di dissociazione del $HgCl_2$, quindi sul suo potere disinfettante, pure esso nella pratica si aggiunge in una certa proporzione nell'intento di impedire che il sublimato in presenza di sostanze proteiche formi composti insolubili, quindi inefficaci; sebbene gli effetti pratici di tale aggiunta siano probabilmente illusori.

Non bisogna dimenticare l'influenza della temperatura e quella del solvente sul potere disinfettante. L'aumento della prima, producendo una maggiore dissociazione, lo rinforza; per ciò che spetta alla natura del solvente, rammentiamo che nell'alcool il sublimato si dissocia in minor grado, perciò ha minore efficacia. Tuttavia l'aggiunta di alcool in ragione del 25-50 per cento alle soluzioni acquose di $HgCl_2$ le rende più attive, ma ciò accade perchè l'alcool è già battericida per sè stesso.

Come per il sublimato, così per altri sali di mercurio, dei metalli pesanti in genere, ed anche di metalli alcalini o alcalino-terrosi, il potere antibatterico è funzione principale del numero dei ioni metallici esistenti nelle soluzioni. Tutto ciò vale per le soluzioni pure, non contenenti composti organici o sostanze proteiche: nel qual caso bisogna tener conto di precipitazioni od altri fenomeni, per cui le soluzioni perdono più o meno della loro efficacia.

Gli alcali e gli acidi hanno efficacia minore dei sali. Negli acidi il metallione essendo sostituito dall'idrogenione, il potere antisettico dovrebbe essere in rapporto solo con la concentrazione di questo. Ma di

fatto in alcuni acidi (nitrico, tricloroacetico) è più forte di quel che consentirebbe il grado di dissociazione; onde bisogna ammettere che alcuni ioni acidi hanno pure azione battericida.

Molte altre sostanze antibatteriche in soluzione agiscono però allo stato molecolare, come la formaldeide, gli alcoli specialmente aromatici, esempio il fenolo, e parecchi dei loro derivati, esempio i cresoli.

Per le soluzioni degli alogeni, cloro, bromo, iodio, e di alcuni ossiacidi, quali sono l'acido nitrico, il bicromato di potassio, il permanganato di potassio, il potere antibatterico è in rapporto col potere ossidante, salvo il cloro, che ha in più un'intensa azione specifica.

Altre notizie generali e le applicazioni pratiche di questo argomento, v. nel vol. II, p. 840 e seg. Qui riportiamo alcuni dati comparativi fra l'azione battericida e sporicida di alcune sostanze.

Azione battericida (sui bacilli della tubercolosi e della peste, sui cocchi piogeni, sul vibrione del colera)		Azione sporicida (sulle spore del *Bacillus anthracis*)	
Soluzione	Morte dopo	Soluzione	Morte dopo
Sublimato 0.1 %	2-10′	Sublimato 0.1 %	oltre 120′
Fenolo 5 %.	1′	Fenolo 5 % .	non ancora dopo 24 ore
Liscivia potassica 0.1-0.2 %	pochi min.	Lisc. pot. 5.6 %	18 ore
Formaldeide 0.2-0.4 %. . . »	»	Formald. 5 %.	120′
Protargolo 1 %	10′	Nitrato d'argento 4.25 % . .	15-60′
Alcool assoluto	2-5′	Acqua di cloro 0.22 %.	2′
Cloruro di calce 1 %	10′	» bromo 0.5 %.	2′

Per ciò che riguarda l'azione sporicida del sublimato, è bene aggiungere che, adoperando come liquido neutralizzante l'acido solfidrico in luogo del solfuro d'ammonio, Ottolenghi vide che le spore del *Bac. anthracis* allo stato umido sopportano, a 25° C. per 24 ore, l'azione del bicloruro di mercurio ad 1.3 %, ed allo stato secco, nelle stesse condizioni, perfino l'azione del sale sciolto al 5.4 %.

H. — AZIONE PATOGENA.

I batteri patogeni sono causa di un grandissimo numero di malattie d'infezione, e si possono distinguere in due gruppi: quelli che producono l'infezione solo quando penetrano in quantità più o meno rilevante nell'organismo animale e quelli che sono capaci d'infettarlo anche in piccolissimo numero: diconsi semiparassiti o patogeni facoltativi i primi, parassiti perfetti o patogeni obbligati i secondi. I primi si coltivano facilmente nei comuni terreni di coltura, e parecchi possono anche fuori dell'organismo condurre vita saprofitaria; i secondi si possono coltivare in terreni speciali e con opportuni espedienti, periscono più o meno presto nell'ambiente, e solo nell'organismo animale trovano le condizioni più favorevoli alla loro vita.

Nel fare tale distinzione, bisogna aver presente che un dato germe può essere patogeno per una specie animale, innocuo per un'altra; rispetto ad una comportarsi come un parassita perfetto, rispetto all'altra come un semiparassita. A rigore quindi ogni volta che si dice un batterio essere patogeno, bisognerebbe sempre aggiungere per quale animale: il concetto di *azione patogena* dei germi è sempre correlativo a quello di *recettività* o suscettività o *disposizione*, che gli animali hanno a permettere in sè stessi l'entrata, la moltiplicazione, le funzioni vitali di quegli esseri.

Dato un germe patogeno ed una specie animale recettiva, perchè l'infezione avvenga, si richiede che il germe penetrato nell'ospite vi rimanga in vita e si moltiplichi, e che produca delle sostanze tossiche o in altro modo rechi danno all'organismo.

Nell'organismo sano è stato riconosciuto che dei batteri, specialmente i cocchi, possono passare per il sangue, senza produrre malattie, almeno entro certi limiti di tempo, pur sempre di molto superiori al rispettivo periodo d'incubazione. Non si hanno sufficienti dati di fatto per dire con sicurezza quale sia il loro destino; ma si può supporre che in alcuni casi finiscano col soccombere alle forze dell'organismo, ed in altri casi restino dentro gli organi allo stato latente, in attesa che una qualche causa diminuisca la normale resistenza dell'organismo e procacci loro condizioni propizie, così che possano moltiplicarsi e svolgere la propria azione patogena, iniziando per conseguenza il processo morboso.

In conformità del concetto esposto vanno interpretati i reperti batterici che Perez, movendo dagl'importanti studi di Manfredi, dimostrò con ricerche sistematiche nelle ghiandole linfatiche di organismi sani.

I microrganismi possono moltiplicarsi nel sangue circolante, oppure localizzarsi principalmente od esclusivamente in alcuni organi o tessuti, e quivi produrre delle sostanze tossiche, le quali si spandono per l'organismo, attaccando le cellule più sensibili. Si sono perciò distinti in produttori di *setticemie* e di *tossiemie*. Esempio classico dei primi il bacillo del carbonchio, dei secondi quello del tetano. Tale distinzione però va accettata per la maggior parte dei batteri con una certa riserva. Infatti il bacillo della difterite, che suole essere tossiemico, talora può passare in circolo, ed è stato ritrovato nel midollo osseo dei malati; d'altra parte non si può escludere che i batteri setticemici agiscano anche per mezzo di veleni, sebbene ancora non se ne sia potuta dare la prova. In molte specie batteriche, le quali prima si credevano sfornite di sostanze tossiche, queste sono state poi dimostrate inoppugnabilmente via via che gli studi sull'argomento si sono allargati ed approfonditi. Possiamo dunque in genere affermare che, a parte i danni meccanici che i produttori di setticemia possono arrecare, la maggior parte dei batteri conosciuti agisce anche per mezzo di veleni.

Dallo stato di setticemia, ch'è dato dalla moltiplicazione dei germi in circolo, suole distinguersi quello di batteriemia, che indica soltanto

la presenza temporanea, accessuale, di batteri passati dai focolai morbosi nel sangue, dove non si riproducono in misura dimostrabile.

Siffatta distinzione è forse un po' troppo convenzionale: è difficile infatti poter asserire o negare con sicurezza se un dato germe presente nel sangue vi si trovi di passaggio, o vi si moltiplichi. Maggiore importanza ha il fatto che solo pochissime specie batteriche non si trovano mai (salvo eccezionalissimi reperti) nel sangue: tali, per esempio, il B. del tetano e il V. del colera.

Il vario grado dell'azione patogena generale dei batteri costituisce la loro *virulenza*, mentre il grado della loro azione tossica dicesi *tossicità*: il concetto di virulenza è naturalmente più largo, e comprende quello di tossicità. Nel caso dei tipici produttori di esotossine i due termini si equivalgono: dire che uno stipite di B. tetanico è virulentissimo val quanto dire che esso è tossicissimo, essendo la sua azione patogena di natura puramente tossica.

La virulenza dei batteri si attenua di solito nelle colture artificiali, specialmente se i sostrati contengono degli zuccheri, e può scomparire del tutto: si ottengono così gli stipiti avirulenti. L'attenuazione o la soppressione della virulenza di alcuni germi si può ottenere del resto per mezzo del calore, o per mezzo di sostanze chimiche, per esempio di fenolo per il B. del carbonchio, di tricloruro di iodio per il B. difterico: con tali metodi si preparano i vaccini batterici. Alcuni germi inoltre si attenuano passando attraverso una serie di animali di una medesima specie: così, p. es., il diplococco della polmonite diminuisce la sua virulenza per il coniglio se vien passato più volte da cavia a cavia; il B. del mal rossino si attenua rispetto al maiale se viene trasmesso per successive inoculazioni da coniglio a coniglio.

D'altra parte la virulenza può essere esaltata, mediante una serie di passaggi attraverso il corpo di animali opportunamente scelti: così lo streptococco esalta notevolmente la sua virulenza dopo essere stato molte volte successive inoculato da coniglio a coniglio o da topo a topo: Marmorek ottenne così uno stipite la cui dose minima letale per il topo era di cmc. 0.001-0.0001 di brodocoltura. L'esaltazione della virulenza, valendo per una specie animale, può non valere per un'altra: così, restando agli esempi fatti, il diplococco attenuato per il coniglio si mostra invece esaltato per la cavia: il B. del mal rossino, mentre si attenua rispetto al maiale, cresce di virulenza per il coniglio.

L'esaltazione della virulenza si può del resto ottenere anche immediatamente, inoculando in adatto animale d'esperimento, insieme col germe patogeno anche un germe non patogeno o i suoi prodotti di ricambio: così può esaltarsi la virulenza del B. dell'edema maligno e del carbonchio sintomatico, inoculando insieme con essi nella cavia il B. prodigioso; lo stesso effetto si ottiene per gli stafilococchi e gli streptococchi inoculandoli nel coniglio insieme con brodocolture filtrate di *Bact. vulgare*.

Anche aggiungendo al germe da esaltare qualche sostanza chimica pura si può conseguire lo scopo: così, per esempio, agisce l'acido lattico rispetto al B. dell'edema maligno.

Veleni in generale.

I veleni batterici hanno parecchi caratteri comuni con gli enzimi. Sono precipitabili con le stesse sostanze, sono la maggior parte poco resistenti all'azione del calore, si conservano meglio allo stato secco, protetti dalla luce e dall'umidità, in piccolissima quantità producono grandi effetti. Ancora similmente agli enzimi possono venire eliminati, via via che sono prodotti, dal corpo batterico, oppure essere in questo ritenuti. Si distinguono perciò i così detti veleni solubili o *esotossine* e i veleni intracellulari o *endotossine.* Le prime si ottengono artificialmente filtrando le colture liquide, le seconde ricorrendo a vari procedimenti di estrazione dei corpi batterici (v. p. 1301).

Oltre a queste due specie di veleni, che si ottengono principalmente con mezzi fisici o con l'uso di qualche sostanza avente una semplice azione dissolutiva sui corpi batterici, ve ne sono altri che si ottengono con metodi chimici ; ossia con serie di operazioni simili a quelle adoperate per separare dei composti proteici dai materiali organici : vi appartengono le *batterioproteine* di Buchner ed i *nucleoproteidi* batterici di Lustig e Galeotti.

Mediante ulteriori manipolazioni delle proteine e delle endotossine sono state poi ottenute altre sostanze tossiche, che non sono più di natura proteica, ma verosimilmente sono prodotti della loro disintegrazione: tali sono la *pirotossina* di Centanni e le *tossine ad effetti acutissimi* di Kraus.

Alcuni batteri inoltre producono delle sostanze che hanno un'azione litica sopra diversi tipi cellulari : si chiamano complessivamente *citotossine* o *citolisine,* e fra esse tengono il primo posto le *emolisine* e le *leucolisine* o *leucocidine.* Fra i prodotti del dissolvimento cellulare operato dai veleni fin qui nominati, vi possono essere sostanze più o meno tossiche alla loro volta : per esempio l'istone, che risulta dal disfacimento dei leucociti. Si possono chiamare *veleni secondari,* contrapponendoli a tutti gli altri, che si dicono *veleni primari.*

Finalmente si conoscono delle sostanze prodotte dai batteri, non tossiche per sè stesse, ma atte a favorire l'infezione, e diconsi *aggressine* ; come d'altra parte esistono nel siero di sangue delle sostanze speciali, che neppur loro sono tossiche, e non sono prodotte dai batteri, ma risultano da alterazioni particolari legate al processo infettivo: così vanno intese le *emolisine secondarie* (De Blasi); così pure possono intepretarsi, in parte almeno, le sostanze fissatrici del complemento dimostrabili nei sieri luetici con la reazione di Wassermann.

Esotossine.

Produttori di esotossine sono i bacilli del tetano, della difterite, del carbonchio sintomatico, della dissenteria, il *Bact. pyocyaneum*, il vibrione del colera, forse anche il B. del tifo. Anche il *Bac. botulinus* produce una esotossina, che dev'essere ricordata a parte perchè si produce fuori dell'organismo animale infetto, nelle carni conservate d'uso alimentare. La potenza di questi veleni è grandissima; del veleno difterico basta inoculare cmc. 0.01-0.005 per uccidere in pochissimi giorni una cavia adulta; del veleno tetanico basta cmc. 0.001-0.0001 per uccidere in 24 ore un topo. Se poi si riflette che i liquidi tossici che si inoculano non sono che semplici soluzioni di tossina, e che, oltre a questa, contengono altre sostanze non tossiche, il loro potere apparirà ancora più grande. Ricordiamo che Brieger da un filtrato di brodocolture del bacillo del tetano, di cui cmc. 0.00005 bastava ad uccidere un topo, ottenne un precipitato di cui gr. 0.0000001 produceva lo stesso effetto; e si aggiunga che, per conseguenza delle manipolazioni chimiche, la metà della sostanza tossica era andata perduta.

Non tutti gli stipiti di una data specie batterica sono atti a produrre tossina, e non tutti quelli che la producono fanno ciò in egual misura. La proprietà tossica può essere perduta da uno stipite permanentemente, al punto da non potersi più distinguere dalle forme simili originariamente non patogene; può essere però talvolta ricuperata in alcune speciali condizioni.

Per paragonare fra loro i veleni prodotti da diversi stipiti di una medesima specie, bisognava stabilire una unità di misura. Questa varia naturalmente per ciascun germe tossico; ma in termini generali possiamo qui dire che si chiama *dose tossica minima letale*, e si definisce come la più piccola quantità di veleno che inoculato per una data via in un animale sano, di specie e peso determinati, ne produce la morte entro un certo numero di giorni.

Così, per esempio, paragonando fra loro due veleni difterici, la cui dose minima letale sia rispettivamente di cmc. 0.005 e 0.01, si vede come il secondo sia due volte più forte del primo.

Vi è ancora un'altra maniera di confronto, che più spesso si adopera per le tossine allo stato solido, ma anche per i filtrati. Si fa cioè il rapporto fra la quantità di veleno che produce la morte ed il peso dell'animale inoculato. Così, riprendendo l'esempio della tossina tetanica secca ottenuta dal Brieger, capace di uccidere nella quantità di gr. 0.0000001 un topo di 15 gr., diremo ch'essa agisce nella proporzione di

$$0\ 0000001 : 15 = 1 : 150{,}000{,}000.$$

Una tossina tetanica la cui dose sia di 0.0000005, agirebbe nella proporzione di 1:30,000,000, cioè sarebbe cinque volte più debole della prima.

Se invece dal rapporto fra il peso della sostanza inoculata e quello dell'animale prendiamo il rapporto inverso, cioè se invece della *concentrazione* in cui essa agisce, consideriamo il grado della sua *diluzione*, il confronto della potenza tossica fra i vari preparati riesce più evidente. La seguente tabella dà un'idea della diversa tossicità di alcuni germi.

Corpi uccisi o prodotti batterici	Animali inoculati	Rapporto { Peso dell'animale / Peso dei preparati tossici secchi
Tossina tetanica	Cavia sotto cute	150 - 1000 milioni
» botulinica	» » »	100 »
» difterica	» » »	2 »
Endotossina dissenterica	Coniglio nelle vene	3 - 100 »
Tubercolina O	Cavia sotto dura	300,000
Corpi del *Bact. enteritidis*	» nel peritoneo	1 ½ milione
» » *Bact. typhi*	» » »	100,000
» » *Vibrio cholerae*	» » »	125,000

Pur non conoscendo la natura chimica delle esotossine, non è però inutile rammentare che la sostanza tossica secca che Brieger ottenne dal filtrato di brodoculture del bacillo del tetano, non conteneva solfo nè fosforo, e delle diverse reazioni delle sostanze proteiche dava soltanto quella del biurete.

In genere le esotossine possono ottenersi allo stato solido adoperando alcuni dei metodi di precipitazione delle sostanze proteiche, oppure producendo nei liquidi che le contengono un precipitato minerale con l'aggiunta di un sale adatto. L'alcool ed il solfato d'ammonio, aggiunto fino a saturazione, sono di uso generale: precipitano le sostanze proteiche, ed insieme con esse il veleno.

Non tutti i metodi di precipitazione dei proteici servono però a separare le tossine: della tossina difterica è noto, per esempio, che essa non precipita con solfato di magnesio nè con solfato di sodio nè con cloruro di sodio.

Il cloruro di calcio agisce in maniera diversa: aggiunto alle brodoculture filtrate, produce un precipitato di fosfato di calcio, e questo meccanicamente trascina seco la tossina. È stato usato questo metodo per la tossina difterica e tetanica.

Le esotossine sono difficilmente dializzabili. Sono sensibili ai vari agenti fisici e chimici: così la tossina difterica viene indebolita dallo stesso alcool che si usa per precipitarla, dall'acido carbonico, dall'etere, dal cloroformio, dall'acetone, dagli ossidanti, laddove rimane intatta in presenza di sostanze riducenti e degli alcali; la tossina botulinica invece è poco sensibile all'azione degli acidi, molto a quella degli alcali. La

luce altera tutte le esotossine in tempo più o meno breve. Il calore distrugge la tossina tetanica alla temperatura di 55° in 90', a 60-65° in 20-30'; distrugge il veleno del carbonchio sintomatico a 50-60° in un'ora; distrugge la tossina botulinica a 80° in mezz'ora; distrugge la tossina difterica a 100° in pochi minuti, e l'attenua fortemente agendo per 12 ore a 58°.

Endotossine.

Come abbiamo detto, le endotossine vengon trattenute nel corpo batterico, quindi si trovano diffuse nei terreni di coltura solo quando un gran numero di germi si sono distrutti: si possono quindi ottenere nei filtrati di brodoculture non molto fresche. Però la tossicità di questi filtrati è sempre debole: endotossine potenti si possono invece ottenere da masse batteriche di colture freschissime su terreni solidi, specialmente su agar, con procedimenti autolitici vari, che sono stati descritti a pag. 1301.

Si distinguono dalle esotossine perchè in generale sono più resistenti al calore e perchè hanno minore tossicità: inoltre diversificano perchè con difficoltà dànno origine alla formazione di antitossine nell'organismo animale.

Quest'ultimo può considerarsi come il criterio più importante per distinguere le endotossine dalle esotossine; ma, si noti bene, la differenza è di grado. Produttori di endotossine sono il B. del tifo, il B. della peste, i bacilli paratifosi, il vibrione del colera, gli stafilococchi, gli streptococchi, lo pneumococco, il meningocco, il gonococco.

Le endotossine producono, inoculate negli animali, ipotermia, ipoleucocitosi e morte in collasso.

Ha un interesse speciale il fatto che dalle agarcolture fresche di B. della dissenteria e da quelle del V. del colera si possono ottenere endotossine, le quali hanno proprietà identiche con le esotossine rispettive che si ottengono filtrando brodocolture di 2-3 settimane degli stessi germi.

Questo caso speciale fa pensare ad un qualche rapporto genetico fra endotossine ed esotossine, ed ha fatto a qualcuno supporre che le esotossine del B. difterico e del B. tetanico non siano *segregate* nello stretto senso parola, ma soltanto dal corpo batterico *eliminate* con grandissima facilità. Accettando questa veduta, cadrebbe la differenza di principio, stabilita da R. Pfeiffer: anche le esotossine sarebbero in fondo veleni intracellulari come le endotossine, salvo la proprietà che esse hanno di liberarsi presto dai corpi batterici. Tuttavia la differenza assegnata da Pfeiffer dev'essere mantenuta allo stato odierno della questione, fino a che per tutti i germi produttori di esotossine non sarà dimostrato quanto è stato visto per il B. della dissenteria e per il V. del colera.

Batterioproteine.

Furono ottenute da H. Buchner, col metodo indicato a p. 1301, dalle colture di *Bact. pneumoniae*, di *Bact. pyocyaneum* e di altre specie batteriche. Le batterioproteine sono tossiche, però la loro azione è principalmente generica: da qualunque specie esse provengono, allorchè s'inoculano in piccole dosi sotto cute negli animali, producono infiammazioni eripelatoidi, leucocitosi e febbre; in forti dosi anche suppurazione; inoculate più volte, fanno morire l'animale con forte dimagramento progressivo; iniettate nel peritoneo o nelle vene in quantità di 0.5-1 gr., dànno la morte in 24 ore con ipotermia, ipoleucocitosi e fenomeni paretici. Non vi è dunque alcun dubbio circa la tossicità delle batterioproteine; però si può dubitare che le sostanze tossiche attive siano di natura proteica, giacchè diversi estratti provenienti da colture di un medesimo germe, per esempio del vibrione del colera, pur contenendo la stessa quantità di proteine, possono dimostrare notevoli differenze nel loro potere tossico (Kruse).

Questa veduta è resa probabile del fatto che Leber ottenne dalle colture di stafilococco una sostanza, che, come le batterioproteine di Buchner, produce suppurazione e necrosi, e che è priva di azoto: dicesi *flogosina*.

Più importanti ancora sono, sotto quest'aspetto, le ricerche di Centanni, il quale ottenne una sostanza che non dà le reazioni proteiche e che è caratterizzata principalmente dal potere pirogeno, onde il suo nome di *pirotossina*. Per ottenerla Centanni filtrò gli estratti tossici acquosi, condensò i filtrati fino a consistenza sciropposa, precipitò con alcool, riprese il precipitato con acqua, ed aggiungendovi del cloroformio o del timolo, sottopose il liquido alla dialisi in acqua distillata. L'acqua veniva rinnovata ogni due giorni, le diverse frazioni mescolate insieme, e con l'evaporazione ridotte a piccolo volume; precipitando con alcool, poi ridisciogliendo il precipitato, e ripetendo più volte tali operazioni, si ha finalmente la pirotossina purificata. Questa, come abbiamo detto, non dà alcuna delle reazioni dei proteici, è solubile in glicerina, in acqua ed in alcool allungato, insolubile in alcool assoluto, in etere, in cloroformio; resiste intatta all'azione della pepsina e della tripsina; non se ne conosce la composizione chimica, ma certo non è un corpo purinico nè un alcaloide (Centanni).

Nucleoproteidi.

Lustig e Galeotti, col metodo indicato a p. 1302, ottennero per primi dai corpi batterici una sostanza proteica chimicamente definita, cioè il nucleoproteide: il primo nucleoproteide isolato fu quello del B. della peste; ma poi fu ottenuto da molti altri germi, così dal vibrione del colera, dal

M. melitensis, dal *Bact. pyocyaneum*, da un batterio che Zardo isolò dal *Mytilus edulis*, dal B. del carbonchio, dal B. del barbone bufalino e da qualche altro.

Chimicamente i nucleoproteidi batterici sono identici a quelli che si possono ottenere dalle cellule degli organismi superiori: insolubili nell'acqua, nell'alcool, negli acidi diluiti; solubili nelle soluzioni alcaline, precipitabili coi sali dei metalli pesanti, col cloruro di zinco, col nitrato d'argento, con l'acido tannico, coi solfati d'ammonio e di magnesio: dànno la reazione di Millon e la xantoproteica, non quella del biurete; digeriti con succo gastrico artificiale, dànno un peptone ed un residuo insolubile ricco di fosforo; bolliti in acido solforico diluito, dànno corpi purinici; contengono circa il 12 % di azoto ed il 0.3-1-2 % di fosforo.

Disciolti in soluzione di carbonato sodico 1 % ed inoculati in una certa quantità nelle vene del coniglio o del cane, producono la morte in pochi minuti per coagulazione intravasale. Hanno azione leucotattica positiva, producono iperleucocitosi e febbre; sono causa di necrosi e di fenomeni proteolitici.

Ma oltre a queste azioni generali, i nucleoproteidi batterici hanno azioni specifiche, riferibili probabilmente alla loro diversa struttura molecolare; tali proprietà specifiche sono state riconosciute per il B. della peste, per il vibrione del colera, per il *M. melitensis* e per altri, e risultano sopra tutto evidenti dalle reazioni immunitarie cui dànno origine.

Tossine ad azione rapida.

Gli studi sull'anafilassi, dei quali sarà dato un cenno più oltre, hanno contribuito a chiarire alcuni punti oscuri nella questione dei veleni batterici, ed hanno provato che dai corpi batterici si possono ottenere delle sostanze tossiche, la cui azione è generica, ma caratteristica, e somiglia, o forse è identica, a quella del veleno anafilattico.

Friedberger, Neufeld e Dold, Sachs ed altri hanno dimostrato che facendo agire sui corpi batterici di varie specie, sensibilizzati con ambocettori specifici, il siero fresco di cavia (complemento), si producono delle sostanze tossiche, le quali inoculate nelle vene della cavia ne provocano la morte in pochi minuti, con sintomi dispnoici e crampi, e con reperto di rigidità e forte distensione dei polmoni; inoculate sotto cute in dose sufficiente producono localmente necrosi, e la morte in 12-20 ore, con ipotermia, ipoleucocitosi e fenomeni paretici.

Tali sostanze tossiche furono ottenute dal B. del tifo, dal B. della tubercolosi, dal vibrione del colera, da quello di Metschnikoff, dal B. prodigioso.

Aronson ha ottenuto le stesse sostanze anche facendo digerire i corpi batterici in sieri normali, privi di ambocettori specifici, come anche in sieri normali inattivati. Alcuni autori, considerando l'uniformità della azione tossica non ostante le diverse specie batteriche adoperate nelle

esperienze, credono che le sostanze tossiche non risultino dai corpi batterici, ma dai proteici del siero col quale sono messi a contatto e che vengono disintegrati da parte degli enzimi batterici; ma Aronson ha provato che le dette sostanze tossiche possono anche ottenersi, almeno dal B. del tifo e dal B. della tubercolosi, senza ricorrere alla digestione in siero, ma semplicemente facendo una densa sospensione delle agarcolture fresche in soluzione fisiologica, e sottoponendola per un'ora allo scotimento, a temperatura di 60-65.° Del resto Neufeld e Dold, poi Aronson, ottennero le stesse sostanze tossiche anche trattando i corpi batterici con lecitina. Aronson pensa quindi che le sostanze tossiche ad azione rapida possono avere doppia origine: o per la digestione dei corpi batterici operata dal complemento, o per la digestione delle proteine batteriche compiuta da enzimi litici appartenenti agli stessi batteri.

Gli effetti generici che producono le endotossine negli animali da esperimento, sarebbero dovuti non alle endotossine tali e quali, ma alle sostanze tossiche più semplici risultanti dalla loro disintegrazione, che nell'organismo si compie con una certa lentezza.

Queste speciali sostanze tossiche sarebbero la causa di alcuni fenomeni generali che si osservano in malattie infettive di varia etiologia, come, ad esempio, nel colera e nelle tossinfezioni alimentari. L'intossicazione da esse prodotta somiglia a quella anafilattica, ed all'intossicazione peptonica: si tratta di composti piuttosto semplici, dializzabili, che non dànno le reazioni proteiche, e sono eliminate con l'urina. Potranno probabilmente essere separati per via chimica allo stato puro. Tale speranza è confortata dal fatto che Barger e Dale hanno ottenuto un composto definito, che è β-iminazolil-etilamina, e che, inoculato nelle vene della cavia, dà la morte in pochi minuti coi sintomi e col reperto proprio dell'intossicazione peptonica.

Veleni speciali.

Benchè tutti i veleni batterici abbiano azione sopra un tessuto o tipo di cellule più che su altri, pure crediamo conveniente distinguere col nome di veleni speciali quelli che, avendo azione sopra alcuni elementi cellulari, non producono mai direttamente la morte degli animali. Importanti sono fra tutte le emotossine od emolisine, e le leucotossine o leucocidine.

Molti batteri hanno la proprietà di sciogliere le emazie, e perciò si dicono emolitici; ma non tutti le sciolgono perchè producono emolisine. Queste si conoscono per lo stafilococco, per gli streptococchi, per alcuni vibrioni. Anche il bacillo del tetano produce una emolisina, che si trova nei filtrati accanto alla tossina propriamente detta. Parecchi germi sono emolitici perchè producono ammoniaca od altre sostanze semplici che possono dissolvere le emazie. Prima dunque di affermare che un germe produce emolisine, bisogna coltivarlo in liquidi nutritivi neutri e ricer-

care se i filtrati, convenientemente neutralizzati quando occorre, possiedono proprietà emolitiche.

Moltissimi germi hanno la proprietà di distruggere i leucociti, ma non tutti per mezzo di leucolisine. Queste sono state dimostrate soltanto per il diplococco della polmonite mediante la ricerca della proprietà leucocida nei filtrati (Casagrandi).

Del resto anche i corpi batterici di altre specie devono contenere una simile sostanza, perchè producono gli stessi effetti locali.

Aggressine.

Oltre i veleni propriamente detti, i batteri possono produrre delle sostanze non tossiche per sè stesse, ma atte a deprimere le forze difensive dell'organismo, onde essi hanno campo di moltiplicarsi rapidamente senza contrasto e d'iniziare quindi il processo morboso. Sostanze di questo genere furono dimostrate da Terni e Bandi per primi, nel bacillo della peste: essi videro che l'essudato peritoneale delle cavie infettate, sterilizzato e mescolato, in quantità per sè stessa innocua, con una dose subletale di bacilli vivi favorisce grandemente l'infezione. Bail ne estese lo studio a molti germi, perfezionò la tecnica, diede il nome di aggressine alle sostanze fautrici dell'infezione, e ne trasse una nuova teoria dell'infettività dei germi. Sul modo di ottenere le aggressine v. p. 1312.

Le aggressine sono state ottenute per i bacilli della peste, del tifo, della dissenteria, della setticemia dei suini, del colera dei polli, per il vibrione del colera, per il *Bact. coli*, per i bacilli paratifosi e capsulati, per gli stafilococchi e streptococchi, per lo pneumococco, per il B. della tubercolosi, per il B. del carbonchio.

Secondo il concetto di Bail, le aggressine vengono prodotte dai batteri patogeni virulenti principalmente nell'organismo invaso; ma per alcuni si possono ottenere anche da colture artificiali, massime in terreni contenenti siero di sangue. Nell'essudato peritoneale chiarificato mediante lunghissima centrifugazione, e sterilizzato con cloroformio, le aggressine trovansi allo stato puro soltanto nel caso dei parassiti perfetti; per gli altri germi sono sempre mescolate in maggiore o minor misura con altri prodotti, e con minime particelle di protoplasma batterico: quindi assolutamente atossiche sono le aggressine dei primi, non così quelle dei secondi. Dializzando in acqua distillata il liquido peritoneale contrifugato e sterilizzato col cloroformio, le aggressine trovansi dentro il dializzatore, e precisamente sono legate alla frazione albumina, mentre le sostanze tossiche precipitano insieme con le globuline (De Blasi). Dializzando delle colture artificiali in soluzione fisiologica, de Waele osservò che, oltre alle aggressine che non dializzano, ve ne sono altre che passano attraverso la membrana e sono differenti dalle prime.

Le aggressine pure sono prodotti di secrezione del corpo batterico, secondo Bail, ed hanno la funzione di tener lontani i leucociti dal punto

di infezione, forse paralizzandone i movimenti: infatti gli essudati peritoneali contengono tanto minor numero di leucociti quanto più sono squisitamente aggressinici. Non possiamo qui dire se i liquidi aggressinici abbiano altro meccanismo d'azione offensiva, occorrendo a ciò la conoscenza dell'azione degli anticorpi, ai quali è riservato uno speciale capitolo: in esso, dunque, riprenderemo l'argomento.

Veleni secondari in colture artificiali.

Con le tossine e con gli altri prodotti batterici di cui si è fin qui parlato non vanno confuse quelle sostanze velenose che si possono trovare nelle colture artificiali di parecchi batteri, e delle quali si è già parlato nel paragrafo delle trasformazioni chimiche. Tali sostanze velenose hanno proprietà simili agli alcaloidi, sono chimicamente definite; inoculate negli animali sensibili, provocano subito l'intossicazione, senza che preceda un vero e proprio periodo d'incubazione o latenza; e sopra tutto nessuna di esse è capace di provocare nell'organismo animale la formazione di anticorpi, cioè sono tutte sfornite di proprietà antigene: sono insomma delle *ptomaine*. I vari veleni che Brieger estrasse dalle colture del bacillo del tetano vi appartengono; ma ben presto fu riconosciuto che essi non hanno che fare con la vera tossina tetanica. Sono stati chiamati *veleni del ricambio* batterico, benchè non possa affermarsi con sicurezza che tutti derivino dal ricambio materiale vero e proprio: possiamo convenire di chiamarli *veleni secondari*, per distinguerli da tutti i precedenti, che sono prodotti di secrezione o sostanze costitutive del corpo batterico e possono dirsi *primari*.

Prodotti secondari nell'organismo.

Anche nell'organismo animale i batteri patogeni possono, oltre che versare le proprie tossine, dare indirettamente origine a sostanze tossiche varie, chimicamente semplici, o a prodotti non tossici, per trasformazioni dei componenti chimici degli umori e dei tessuti.

Per avere un'idea delle sostanze tossiche prodotte in tal modo indiretto dall'azione patogena dei batteri, si ricordino le ricerche del Carbone, il quale osservò come per la distruzioni dei leucociti operata dagli pneumococchi inoculati sotto cute, o per altra via che non sia la venosa, si libera da quelli il nucleoistone, e da questo può scindersi poi l'istone, che ha proprietà tossiche.

Similmente per l'azione emolitica dei batteri nell'organismo vengono distrutte delle emazie, e per conseguenza di siffatta distruzione possono comparire nel siero di sangue delle sostanze speciali, che si dimostrano per il loro potere isoemolitico (De Blasi): sono dunque delle sostanze le quali non hanno che fare nè con le emolisine batteriche, nè con le emolisine specifiche complesse, di cui sarà parlato a suo tempo.

Esse non sono dimostrabili nel siero tal quale si ottiene dal sangue per coagulazione, o per defibrinazione e consecutiva centrifugazione, ma solo nel siero riscaldato a 55-65° C. Finchè non si conoscerà la natura chimica di queste sostanze, che si possono dimostrare nel siero in seguito alla distruzione di emazie, anche per altre azioni emolitiche indipendenti dai batteri, si possono chiamare *emolisine secondarie*.

J. — PROPRIETÀ ANTIGENE.

Nel siero di sangue di uomini o animali naturalmente ammalati di una data infezione compaiono in generale delle proprietà nuove, che son dovute alla formazione di sostanze specifiche rispetto alla causa morbigena, e si chiamano complessivamente *anticorpi*: negli animali sperimentalmente infettati accade la stessa cosa. Ora la maggior parte degli anticorpi conosciuti si possono anche ottenere nel siero degli animali, inoculando loro, una o più volte, dosi subletali di batteri vivi virulenti o attenuati, oppure di batteri uccisi, di estratti batterici, di prodotti tossici inalterati o attenuati, ed anche inoculando prodotti originariamente atossici: insomma un'abbondante formazione di anticorpi nell'organismo si può conseguire pur senza produrre infezioni o intossicazioni gravi o leggiere.

La natura e la quantità degli anticorpi che si ottengono varia con la qualità e quantità di ciò che s'inocula, la specie animale d'esperimento e la via d'introduzione, secondo che si fa una sola o più iniezioni ripetute ad intervalli convenienti, e secondo altre condizioni che hanno valore più o meno preponderante nei diversi casi speciali.

Gli anticorpi sono prodotti di reazione delle cellule dell'organismo sotto lo stimolo di alcuni componenti chimici del protoplasma batterico: allorchè s'inoculano dei batteri morti, il corpo di questi si dissolve e gli elementi che ne risultano agiscono sul protoplasma cellulare; ed anche quando i batteri introdotti sono vivi, una parte di essi sempre soccombe, e dal loro corpo morto si producono le sostanze attive.

Questa medesima spiegazione vale naturalmente per gli estratti e per i prodotti batterici, i quali anzi rappresentano talora essi stessi direttamente la causa delle reazioni protoplasmatiche, come accade per le tossine in particolar modo.

I componenti del protoplasma batterico che, comunque modificando il protoplasma delle cellule dell'organismo, provocano queste a formare gli anticorpi, si chiamano tutti insieme *antigeni*, e v'è ragione di ammetterne tanti quanti sono gli anticorpi conosciuti. Ad ogni antigeno corrisponde il suo anticorpo, e viceversa; anzi in tanto conosciamo l'esistenza degli uni e degli altri in quanto si svelano reciprocamente ed hanno relazioni strettamente specifiche.

La proprietà antigena, cioè di dar luogo nell'organismo animale alla formazione di anticorpi, non è esclusiva dei batteri: parecchi tipi cellulari degli organismi superiori, principalmente le emazie, si comportano in modo analogo alle cellule batteriche; similmente si comportano anche parecchi enzimi, e le proteine eterogenee. Ciò prova che la formazione di anticorpi ha carattere generale, non essendo essa limitata al solo campo delle malattie infettive.

Per effetto della produzione di anticorpi, dopo un certo tempo, l'organismo animale trovasi di fronte ai rispettivi antigeni in condizioni diverse dalle antecedenti sue condizioni normali: in alcuni casi, come tipicamente avviene per la formazione di antitossine, l'organismo acquista un altissimo grado di resistenza specifica (*immunità attiva*); in altri casi invece si stabilisce uno stato di minor resistenza (*ipersensibilità, allergia attiva, anafilassi*) verso i corrispondenti antigeni, come accade allorchè per via parenterica s'introducono proteine eterogenee nell'organismo.

Inoculando in animali sani il siero di animali resi immuni o ipersensibili, si può conferire uno stato d'*immunità passiva* o d'*anafilassi passiva*; la forma passiva dell'immunità o dell'anafilassi differisce dalla forma attiva, precedentemente nominata, perchè consegue immediatamente all'iniezione del siero, ed ha breve durata, laddove la forma attiva si stabilisce solo dopo un certo periodo di latenza, variabile secondo i casi, per lo più di alcuni giorni, ed è di gran lunga più durevole.

La sieroterapia di alcune malattie infettive consiste nel conferire una immunità passiva ai malati, inoculando loro sieri specifici, *antitossici* od *antibatterici*: dei primi è noto che agiscono per le antitossine che contengono; della maggior parte dei secondi si presume che agiscano per le batteriotropine, più che per le batteriolisine che possono contenere, ma di qualcuno è ancora ignoto o discusso il meccanismo d'azione. Dei sieri antibatterici alcuni si ottengono immunizzando gli animali con un solo stipite, e diconsi *monogeni*; altri si hanno immunizzandoli con più stipiti o con più varietà di una medesima specie, e diconsi *poligeni*. Fra i secondi si distinguono ancora quelli che provengono da una specie animale unica, e che diconsi *multiparziali*, e quelli che sono composti dalla miscela di sieri provenienti da più animali di specie differente immunizzati con diversi stipiti, e che portano il nome di sieri *polivalenti*. Questa è la distinzione fatta da Wassermann e Ostertag, ma usualmente si fa uso promiscuo degli attributi multiparziale e polivalente.

Abbiamo di già chiarito come non è possibile di parlare degli antigeni senza discorrere insieme dei rispettivi anticorpi: passiamo ora in breve rassegna gli uni e gli altri, avvertendo che nel primo capitoletto, quello delle tossine ed antitossine, avremo occasione di toccare anche di alcune questioni che, essendo state bene illustrate sopra tutto per tali specie di sostanze specifiche, hanno valore generale per tutti gli antigeni ed anticorpi.

Tossine ed antitossine.

Intendiamo qui parlare delle esotossine, quali sono quella del B. difterico, del B. tetanico e di altri pochi: esse, inoculate in adatti animali d'esperimento, con le necessarie precauzioni, producono una forte immunità antitossica. Tale immunità ha caratteri distintivi considerevoli rispetto a quello stato di refrattarietà che, mediante l'assuefazione, si può ottenere verso veleni chimicamente ben definiti e semplici, come l'arsenico, la morfina, ecc. Una prima differenza è già questa, che l'assuefazione a siffatti veleni produce bensì un grado di refrattarietà notevole, ma di gran lunga meno potente di quello che consegue all'immunizzazione con le tossine batteriche: la seconda differenza, che è la più importante, sta nel fatto che il siero degli animali assuefatti ai veleni chimici non contiene mai contravveleni, quindi inoculato in animali non assuefatti resta senz'alcuna efficacia sui veleni corrispondenti; laddove il siero degli animali immunizzati con le tossine batteriche contiene antitossine specifiche in gran copia, ed è in minime quantità capace di sopprimere gli effetti di forti dosi delle rispettive tossine, allorchè viene con queste inoculato negli animali sensibili.

La proprietà antitossica non è del resto esclusiva delle sole tossine batteriche: le filotossine, come la ricina, l'abrina, la crotina, la robina, ecc., che sono veleni speciali del sangue, e le zootossine, come il veleno dei serpenti, quello degli scorpioni, quello del sangue delle anguille ed altri, sono tutti capaci di provocare la formazione di antitossine specifiche, allorchè vengono inoculate in animali adatti con processi d'immunizzazione analoghi a quelli usati per le tossine batteriche.

Tutti questi veleni di origine vegetale od animale appartengono alle sostanze proteiche, precisamente alle albumose e perciò si chiamano anche tossalbumose.

Per i veleni che, come la ricina, l'abrina, ecc., hanno azione elettiva sul sangue, la proprietà antitossica del siero degli animali immunizzati può essere dimostrata, oltre che *in vivo*, anche *in vitro* (v. p. 1294): anzi le esperienze *in vitro* hanno chiarito parecchi punti di grande interesse circa l'andamento del fenomeno di neutralizzazione specifica delle tossine in genere per opera delle antitossine.

Immunizzazione con le tossine. — Crediamo utile dare un esempio dei procedimenti d'immunizzazione, e scegliamo il caso di un cavallo che si voglia immunizzare con la tossina difterica. Le prime volte si devono inoculare piccolissime dosi di veleno, ottenuto per lo più da brodocolture di tre settimane, ed attenuato mediante il riscaldamento per un'ora a 65-70°, o con l'aggiunta del 0.05-0.4 % di tricloruro di iodio o di soluzione di Lugol: si può anche inoculare una miscela di tossina ed antitossina con lieve eccesso della prima.

Adoperando il veleno attenuato con soluzione di iodio, se ne inocula sotto la cute del collo ¼ di cmc., e poi, con intervalli di 48 ore, ½ cmc. per 3-4 volte; dopo 5-6 giorni se ne inocula un cmc. Dopo queste inoculazioni in genere l'animale non presenta nessuna alterazione locale nè generale, ed acquista un certo grado d'immunità, che dicesi fondamentale. Dopo 3-4 giorni si può inoculare il veleno non più attenuato, e si comincia con ¼ di cmc.: questa volta si nota per lo più un leggiero edema, senza febbre. Passati altri 5-6 giorni, s'inocula un cmc. di veleno, e poi ogni 2-3 giorni, una quantità a poco a poco crescente, fino a raggiungere i 5-10 cmc. verso il 40° giorno. Fra il 40° e il 70° giorno le dosi da inoculare possono crescere fino a 10-20-30 cmc. ogni volta, in modo che alla fine di questo periodo il veleno iniettato può essere di 60-80-90 cmc. Passato questo periodo, si possono introdurre 100-200 e più cmc. di veleno ogni volta. Ad ogni inoculazione di veleno puro consegue edema locale più o meno forte, che scompare di solito in 24 ore, inappetenza e leggiero aumento di temperatura. Le ultime inoculazioni possono farsi nelle vene. L'animale, salassato 10-12 giorni dopo l'ultima inoculazione, fornisce un siero di alto potere antitossico.

Passato qualche tempo dopo il salasso, l'animale può ricevere altre forti quantità di veleno, con che si mantiene o si rinforza il potere antitossico del suo siero; le cavate di sangue possono farsi più volte, ad intervalli convenienti.

Con metodi poco differenti, ma sostanzialmente simili, s'immunizza il cavallo rispetto alla tossina tetanica, come altri animali rispetto ad altre esotossine in genere.

Bisogna però avvertire che lo schema riferito non serve ad altro che a dare un'idea del come si procede schematicamente nell'immunizzazione; nella pratica, da caso a caso, si fanno al metodo varie modificazioni, concernenti la quantità del veleno, la durata degl'intervalli, la via di inoculazione, tutte condizioni che l'immunizzatore cerca di regolare sulla guida delle reazioni presentate volta per volta dall'animale: è giusto dire dunque che l'immunizzare è un'arte.

Comparsa delle antitossine nel siero. — Le antitossine che l'organismo produce non sono dimostrabili nel siero subito dopo l'introduzione della tossina: passano sempre alcuni giorni, che rappresentano il periodo di latenza. Così l'antiricina compare nel siero, in modo brusco, cioè criticamente, come dice Ehrlich, soltanto 6 giorni dopo l'iniezione della ricina: analoghe osservazioni sono state fatte per l'antitetanotossina, per l'antitossina difterica e per altre. Facendo una seconda inoculazione di tossina, quando già nel siero è dimostrabile e dosabile una data quantità di antitossina, si ha in primo tempo una diminuzione più o meno forte di questa, la quale solo più tardi aumenta, raggiungendo il pristino valore e superandolo. Dicesi *fase negativa* il periodo in cui il contenuto di antitossina mostrasi diminuito. La fase negativa si ripresenta

ad ogni nuova inoculazione, pur essendo sempre variabile, e suole diventare sempre più breve e meno intensa.

La quantità di antitossina presente nel siero cresce in misura grandissima col procedere dell'immunizzazione, ma, raggiunto un certo valore, non aumenta più, anzi talvolta può diminuire.

Produzione delle antitossine. — Fu creduto che le antitossine non fossero altro che le stesse tossine trasformate nell'organismo, in cui vengono introdotte, per opera dell'organismo stesso. Tale ipotesi non è accettabile. Anzi tutto una conseguenza logica di essa è che dovrebbe sussistere un qualche rapporto quantitativo fra tossina inoculata ed antitossina presente nel siero: l'esperienza invece ha provato che la quantità di antitossina è infinitamente maggiore di quella che occorrerebbe per neutralizzare tutta la tossina inoculata durante il processo d'immunizzazione. Una seconda conseguenza della stessa ipotesi è che, dopo un abbondante salasso, il contenuto d'antitossina nel siero dell'animale dovrebbe diminuire e restare permanentemente scarso, purchè non s'introduca nuova tossina: invece un'esperienza di Roux e Vaillard ha dimostrato che dopo ripetuti abbondanti salassi l'antitossina diminuisce, ma poi aumenta di nuovo fino a raggiungere il valore primitivo, senza che più nuova tossina venga inoculata.

Talora però un animale fortemente immunizzato si dimostra un bel momento improvvisamente ipersensibile alla tossina inoculata anche in quantità minime (fenomeno di Behring). Behring osservò che in cavie immunizzate con la tossina difterica può bastare l'inoculazione di $^1/_{700}$-$^1/_{800}$ di dose minima letale per ottenerne la morte con sintomi e reperto caratteristici. È un fenomeno che ricorda alcuni fatti d'anafilassi, benchè sia suscettivo di altra interpretazione.

Bisogna ammettere che le antitossine sono prodotte dalle cellule, per effetto dell'azione che le rispettive tossine esercitano sul loro protoplasma.

A conforto di quest'asserzione stanno parecchi fatti, fra i quali ricordiamo che alcune sostanze, le quali stimolano le secrezioni cellulari in genere, provocano anche una più copiosa formazione di anticorpi: così, per esempio, le iniezioni di pilocarpina hanno per effetto di accrescere la produzione di antitossina difterica (Salomonsen e Madsen).

Proprietà delle antitossine. — Non si conosce precisamente la natura chimica delle antitossine; si crede che siano probabilmente sostanze proteiche. Sono in generale più resistenti delle rispettive tossine: così restano quasi inalterate dopo un riscaldamento a 60°, e si attenuano soltanto per un prolungato riscaldamento a 70°. Vi sono tuttavia delle antitossine meno resistenti delle rispettive tossine all'azione del calore: tali sono quella contro il veleno dei serpenti e quella contro la tossina del B. piocianeo.

Le antitossine sono pochissimo diffusibili, e precipitano insieme con le sostanze proteiche dal siero che le contiene. Mediante la precipita-

zione frazionata con solfato d'ammonio, Pick riconobbe che le proprietà antitossiche dei sieri antitetanico ed antidifterico ottenuti dal cavallo restano legate principalmente alla pseudoglobulina, ed in assai minor misura alla euglobulina, mentre la fibrinoglobulina e l'albumina ne sono sprovviste.

Azione delle antitossine. — Abbiamo già detto che, mediante l'immunizzazione con una tossina, l'animale trattato diventa immune, e che il siero del suo sangue ha la proprietà di neutralizzare il rispettivo veleno in modo che, inoculando la miscela in animali sensibilissimi, ogni effetto tossico resti soppresso. I sieri antitossici hanno però anche potere preventivo e curativo, potendo impedire l'intossicazione letale degli animali, sia che vengano inoculati prima dell'iniezione del veleno, sia che vengano inoculati dopo: soltanto la dose occorrente in tali casi è molto maggiore di quella bastevole per la neutralizzazione immediata.

L'azione delle antitossine sulle tossine è altamente specifica. La dose di siero antitossico capace di neutralizzare il corrispondente veleno è sempre piccolissima: così, per esempio, la più piccola quantità di siero antidifterico che può neutralizzare 100 dosi minime letali di tossina, e che dicesi *unità immunizzante*, può essere rappresentata da cmc 0.005-0.002-0.0015. Oltre a ciò, è sempre possibile di neutralizzare 1000-2000 e più dosi minime letali di tossina, purchè si adoperino dosi equimultime di siero antitossico: cioè la neutralizzazione segue la legge delle proporzioni multiple.

Circa il meccanismo d'azione dell'antitossina, Metschnikoff pensò che essa non fosse altro che stimolatrice della fagocitosi, onde i fagociti stimolati, incorporando la tossina, la renderebbero innocua, digerendola. Buchner invece pensò che l'antitossina agirebbe sulle cellule sensibili dell'organismo animale, rendendole insensibili all'azione della tossina. Però queste ipotesi, per le quali all'antitossina spetterebbe un'azione indiretta, non sono più accettabili, dopo le numerose esperienze, che lo spazio non consente di qui riferire, fatte da Ehrlich e da altri per dimostrare che ogni antitossina agisce direttamente sulla sua tossina, rendendola innocua.

L'innocuità delle miscele di tossina ed antitossina non dipende dalla distruzione della prima. Infatti Roux e Calmette, riscaldando fino all'ebollizione una mescolanza innocua di veleno dei serpenti e del rispettivo siero antitossico, poterono ricuperare intatto il veleno stesso; Wassermann dimostrò, col medesimo espediente, che anche la tossina piocianica non viene distrutta o scomposta dall'antitossina; inoltre Martin e Cherry, filtrando una miscela innocua di ofiotossina ed antitossina sotto forte pressione, ottennero nel filtrato la tossina separata dall'antitossina. Tuttavia queste esperienze sono suscettive di una obbiezione, perchè gli espedienti del riscaldamento e della filtrazione erano messi in opera poco dopo fatta la miscela, quindi presumibilmente avanti che

l'antitossina avesse potuto compiere tutta la sua azione. Più sicura è invece la dimostrazione data da Morgenroth: egli lasciò riposare per qualche giorno una mescolanza innocua di cobratossina e antitossina, avendovi aggiunto un po' di acido cloridrico, poi la riscaldò a 100° per distruggere l'antitossina, e così ricuperò intatta la termostabile cobratossina.

L'antitossina dunque rende innocua la tossina, combinandosi con essa, dando luogo così ad un composto neutro inattivo. Che si tratti realmente di un fenomeno chimico è provato indirettamente dal fatto che la temperatura e la concentrazione hanno una grande influenza sulla velocità di reazione per cui l'antitossina neutralizza la tossina; le temperature piuttosto alte favoriscono la reazione assai più delle basse, le concentrazioni maggiori assai più delle minori. Inoltre Arrhenius e Madsen poterono direttamente constatare che, allorchè si combina una grammolecola di tetanolisina con una grammolecola di antitetanolisina, si ha una reazione esoterma, con produzione di 600 calorie.

La neutralizzazione della tossina per opera dell'antitossina avviene, secondo Arrhenius e Madsen, conforme all'andamento della combinazione di una base e di un acido debole. Essi notarono e riportarono in grafica, in un sistema di coordinate cartesiane, il grado d'emolisi prodotto da parecchie miscele contenenti una quantità fissa di tetanolisina, e quantità gradatamente crescenti di antitetanolisina, e riconobbero che la linea ottenuta riunendo i diversi punti non è una retta, ma una curva riproducente quella che corrisponde alla neutralizzazione di un equivalente di ammoniaca da parte di quantità a grado a grado crescenti di acido borico. Il confronto risulta ancora più calzante, perchè l'ammoniaca, avendo una forte azione emolitica, può considerarsi come un'emotossina analoga alla tetanolisina, e l'acido borico, che neutralizzandola ne impedisce l'azione emolitica, può considerarsi come un'antitossina.

Arrhenius crede che in generale tossine ed antitossine facciano sempre delle combinazioni simili a quelle dell'ammoniaca e dell'acido borico. Per ciò che spetta ai veleni emolitici, quali sono la tetanolisina, la stafilolisina, la ricina, l'abrina, ecc., si è oramai d'accordo nel riconoscere la giustezza delle vedute di Arrhenius; non così per la difterotossina, che secondo Ehrlich invece si combina con l'antitossina come una base forte fa con un acido forte. Tale differenza fra Ehrlich e Arrhenius conduce, come or ora vedremo, a diversi concetti circa la costituzione del veleno batterico meglio studiato, cioè del veleno difterico.

Costituzione del veleno difterico desunta dal suo comportamento verso l'antitossina. — Ciò che diremo su tale questione si riferisce al veleno difterico, ma vale anche per quello del carbonchio sintomatico, secondo gli studi di Grassberger e Schattenfroh.

La costituzione del veleno difterico fu stabilita da Ehrlich con innumerevoli esperienze di straordinaria finezza: qui ricordiamo soltanto le cose principalissime.

Il veleno difterico (conveniamo di chiamare veleno il filtrato tossico delle brodocolture) si attenua col tempo, ma, pur attenuandosi, richiede sempre la medesima quantità di antitossina per essere neutralizzato; in altri termini, mentre la tossicità del veleno diminuisce, resta immutata quantitativamente la sua proprietà di combinarsi con l'antitossina. Diamo un esempio:

Si abbia un veleno la cui dose minima letale sia di cmc. 0.01; la quantità di antitossina occorrente per neutralizzare 1 cmc. di tal veleno, cioè 100 dosi minime letali, sarà per definizione una unità immunizzante (UI). Dopo qualche tempo supponiamo che la dose minima letale (dml.) del veleno sia di 0.02; ebbene, anche allora la quantità minima di antitossina occorrente per neutralizzare 1 cmc. di veleno sarà di una UI: da ciò risulta che una UI neutralizza del veleno fresco 100 dml., del veleno invecchiato solo 50 dml. Da ciò, secondo Ehrlich, si arguisce che una parte della tossina, nel caso nostro speciale una metà, si è trasformata in una modificazione atossica, che tuttavia conserva la proprietà di combinarsi con l'antitossina. Tali modificazioni atossiche della tossina si chiamano *tossoidi*. Vi sono dei tossoidi che hanno anzi per l'antitossina un'avidità maggiore della stessa tossina, e diconsi *protossoidi*: altri l'hanno uguale e si chiamano *sintossoidi*. Non possiamo qui descrivere il così detto metodo delle saturazioni parziali, che diede a Ehrlich il fondamento sperimentale per distinguere varie specie di tossoidi: ricordiamo solo che egli fu indotto ad ammettere la esistenza di tre specie di tossina difterica, che si possono distinguere per la loro diversa affinità di combinazione per l'antitossina, e che, in ordine di affinità decrescente, si chiamano prototossina, deuterotossina, tritotossina: di ciascuna specie vi sono due modificazioni, la α e la β, la prima più facilmente della seconda trasformabile in protossoidi, deuterotossoidi e tritotossoidi, differenziabili come le rispettive tossine da cui provengono per la differente affinità di combinazione con l'antitossina: le due ultime sorte di tossoidi sono quelle che complessivamente portano il nome già ricordato di sintossoidi.

La modificazione β della deuterotossina è la porzione più stabile di tutte, ed è quella che non manca mai nei veleni anche molto invecchiati.

Un altro fatto importante stabilito da Ehrlich è questo: supponiamo di neutralizzare perfettamente 100 dml. di un dato veleno con una UI, e di aggiungere poi alla miscela neutra 1-2-10-20 o più dml. dello stesso veleno: si osserva allora che, contro ogni aspettazione, le miscele contenenti tante dml. in eccesso non producono la morte degli animali in cui vengono inoculate, ma solo dànno fenomeni locali, consistenti in infiltrazione sottocutanea, alopecia e necrosi locali, ed in fenomeni paralitici che si rendono manifesti in terza settimana; tali fenomeni si producono con tanto maggior frequenza ed intensità, quanto maggiore è il numero delle dml. in eccesso. Perchè nelle miscele neutre cui si

aggiunge sempre nuovo veleno resti *libera, quindi efficace*, una dml. di tossina, bisogna aggiungere in generale parecchie dml. di veleno; ed in alcuni pochissimi casi ad Ehrlich occorse di doverne aggiungere fino a 101. Precisando questo caso estremo, possiamo dunque dire che una UI è capace di neutralizzare 100 dml. di veleno difterico *perfettamente*, cioè senza mai comparsa di lesioni locali nè di fenomeni paralitici postumi; ma è anche capace di neutralizzarne di più, perfino 200 dml., salvo che in tali casi la neutralizzazione non è *perfetta*, cioè essa è bensì ancora capace di impedire la morte dell'animale, ma non più le alterazioni locali ed i fenomeni paralitici.

La quantità di veleno che è perfettamente neutralizzata da una UI ha ricevuto da Ehrlich la denominazione di *limite zero* e la notazione L_0; la quantità di veleno che aggiunta ad una UI fa sì che si renda libera ed attiva una dml. di tossina dicesi *limite morte* e si indica col segno L_+. Nel caso tipico preso ad esempio, ammettendo che la dml. del veleno sia di cmc. 0.01, sarebbe $L_0 =$ cmc. 1 (pari a 100 dml.), $L_+ =$ cmc 2.01 (pari a 201 dml.).

A che cosa è dovuto questo singolare comportamento?

Secondo Ehrlich all'esistenza di una speciale sostanza tossica, che per sè non produce la morte, che cagiona dopo due o tre settimane i fenomeni paralitici, che si trova sempre accanto alla tossina propriamente detta, in proporzione variabile, ma originariamente (cioè nei filtrati di brodocolture freschissime) in ugual quantità, e che è capace di combinarsi con l'antitossina, avendo per questa un'avidità minore della tossina: tale sostanza speciale dicesi *tossone*.

Con questa ipotesi, il fenomeno descritto si spiegherebbe nel seguente modo: un cmc. del veleno esaminato, cioè la quantità L_0, contiene 100 unità di tossina, e 100 di tossone, e l'UI del siero contiene 200 unità di combinazione, con le quali neutralizza tutta la tossina e tutto il tossone.

Aggiungendo ora alla miscela una dml., non si fa che aggiungere un'altra unità di tossina ed un'altra di tossone; l'unità di tossina aggiunta si appropria una unità antitossica di combinazione, strappandola ad una delle unità di tossone già combinate; così che non rimane tossina libera, bensì restano libere nella miscela due unità di tossone. Aggiungendo 2 dml., accadrà un fatto analogo e resteranno libere quattro unità di tossone; aggiungendo 10 dml., saranno libere 20 unità di tossone, e così via. La quantità di tossone liberato cresce sempre; ma una unità di tossina resterà libera soltanto quando tutte le 200 unità di combinazione dell'antitossina saranno occupate da altrettante di tossina precedentemente aggiunta, quindi soltanto quando si aggiungano alla primitiva miscela neutra 101 dml. di veleno.

L'esistenza del tossone è stata messa in dubbio da Arrhenius, il quale spiega le manifestazioni speciali che diconsi tossoniche, ossia le paralisi tardive, con l'incompleta neutralizzazione della tossina: invero egli, ammet-

tendo che la tossina con l'antitossina formino una combinazione analoga a quella dell'ammoniaca con l'acido borico, asserisce che, anche quando sia eccedente la quantità di antitossina aggiunta alla tossina, una piccola parte di questa rimane sempre libera, così che, senza ancora essere capace di produrre la morte, tuttavia può dare i fenomeni tossonici; analogamente a quanto si osserva allorchè si aggiungono ad un equivalente d'ammoniaca 1, 2, 3 o più equivalenti di acido borico, che l'ammoniaca libera diminuisce sempre più, ma ne rimangono pur sempre delle tracce dimostrabili. Tale ipotesi di Arrhenius però non dà, secondo Ehrlich, una spiegazione plausibile dello speciale caso estremo riferito, e che più d'una volta fu da lui verificato.

Endotossine ed antiendotossine.

Anche con le endotossine possono immunizzarsi degli animali.

La comparsa di antiendotossine nel siero degli animali fu per lungo tempo negata; ma ora, dopo gli studi di Macfadyen, Besredka, Kraus, non vi è dubbio che tali anticorpi si producano: sono stati infatti dimostrati nel siero di animali immunizzati con endotossina tifosa e colerica. La neutralizzazione avviene sostanzialmente come fra le esotossine e le rispettive tossine; vi è però una differenza, che la legge delle proporzioni multiple è valevole solo fino a un certo punto. Infatti mescolando convenienti quantità di un siero antiendotossico con poche dml. di endotossina, in generale 8-10, in ogni modo non oltre 20-30, si riesce a renderla innocua; per neutralizzare un numero di poco maggiore di dml. bisogna aggiungere quantità sproporzionatamente grandi di siero; ed un numero di dml. ancor maggiore non può essere più neutralizzato per quanto si aumenti la quantità di siero.

Nei sieri antiendotossici sono dimostrabili, oltre alle antiendotossine, anche delle batteriolisine (vedi più oltre): ciò non fa meraviglia, quando si pensi che si dà il nome di endotossina non ad un veleno puro, perfettamente isolato, ma ad un estratto batterico, che è naturale contenga, oltre le endotossine propriamente dette, anche altri antigeni, quindi i lisinogeni, i quali appunto provocano la formazione delle batteriolisine.

Agglutinogeni ed agglutinine.

La formazione di agglutinine è una delle reazioni che avvengono più facilmente nell'organismo animale. Si ottengono artificialmente inoculando batteri vivi in dosi subletali, o uccisi col calore, o con mezzi chimici, e si riscontrano nel siero di sangue dei malati e convalescenti di varie infezioni, principalmente tifo, paratifo, dissenteria, febbre mediterranea, colera. In più scarsa misura possono anche dimostrarsi nella tubercolosi, nella pertosse, nella peste, ecc.

Artificialmente, abbiamo detto, si possono ottenere le agglutinine immunizzando gli animali coi più diversi batteri; naturalmente il potere agglutinante dei sieri che si ottengono varia secondo la specie batterica, la specie dell'animale inoculato, la quantità e gli eventuali trattamenti preliminari del materiale antigeno, la via ed il numero delle inoculazioni.

Proprietà delle agglutinine. — Come le antitossine, così pure le agglutinine compaiono nel siero bruscamente, dopo un periodo di latenza consecutivo all'iniezione degli agglutinogeni: secondo Jörgensen e Madsen tale periodo è di 3-4 giorni.

Circa la natura chimica delle agglutinine si può ripetere quanto è stato detto per le antitossine. Ricordiamo in particolare che nel siero di cavallo le tifoagglutinine sono legate alla pseudoglobulina, nel siero di capra o coniglio o cavia alla euglobulina; che le coleragglutinine sono legate alla euglobulina tanto nel siero di cavallo quanto in quello di capra (Pick); che le agglutinine specifiche per il *M. melitensis* sono in gran prevalenza nel siero umano legate alla pseudoglobulina (Levi della Vida).

Le agglutinine sopportano senza alterarsi il riscaldamento a 58°-60° per un'ora.

Fenomeno dell'agglutinazione. — Allorchè dei batteri vengono sospesi in un siero specificamente agglutinante, dopo un tempo variabile per lo più da pochi minuti a 2 ore o poco più, si nota quanto segue. Anzi tutto, se i batteri sono mobili, cominciano con l'essere paralizzati nei loro movimenti; tale fase manca naturalmente nei batteri immobili. Il fatto più evidente però è rappresentato dalla formazione di accumoli batterici, in principio piccoli, da ultimo grandi e costituiti di parecchie diecine e centinaia d'individui. Gli accumoli, i quali finchè non raggiungono certe dimensioni sono visibili soltanto al microscopio, si riuniscono poi a formare dei fiocchetti o grumetti, visibili anche ad occhio nudo: finalmente i fiocchetti, divenuti più grossi, precipitano al fondo della provetta, lasciando il liquido soprastante limpido.

La reazione è favorita dalla temperatura di 38°-40°, ed è più o meno intensa e rapida secondo il grado della diluzione di siero in cui i batteri sono sospesi.

Il fenomeno è specifico; ma bisogna avvertire che certi stipiti, appartenenti a varie specie batteriche, possono spontaneamente agglutinarsi in una semplice soluzione di cloruro sodico: il fenomeno dipende dalla concentrazione di questa ed è sempre possibile trovare una concentrazione tale che l'agglutinazione spontanea non avvenga più.

Meccanismo d'azione. — Circa il meccanismo d'azione fra le agglutinine e gli agglutinogeni, fu già da Joos ammessa una combinazione chimica con intervento necessario di cloruro di sodio. Se non che, se-

condo Arrhenius, si tratta di un semplice assorbimento, regolato dalla legge di ripartizione: l'agglutinina, messa a contatto coi corpi batterici, penetra in parte in essi ed in parte resta nel liquido circostante; la concentrazione C_1 dell'agglutinina assorbita dai corpi batterici e quella C_2 dell'agglutinina rimasta libera hanno fra loro un rapporto costante rappresentato dalla formula $\frac{C_1^2}{C_2^2} = K$, analogamente a quanto avviene della distribuzione dell'acido benzoico fra due solventi diversi, come l'acqua ed il benzolo.

Secondo Biltz però i risultati delle ricerche possono anche essere interpretati conformi alle leggi dell'assorbimento superficiale (*adsorbimento*) quale si osserva, per esempio, sbattendo una soluzione di albumina con polvere di carbone.

Ad accettare una di queste due ipotesi si può tuttavia essere poco inclini pensando al carattere specifico delle agglutinine, benchè Arrhenius abbia prevenuto questa obbiezione alla sua ipotesi, asserendo che la permeabilità della membrana batterica si verifica soltanto verso la rispettiva agglutinina specifica.

Comunque avvenga la fissazione dell'agglutinina al corpo batterico, certo è che la presenza del cloruro di sodio è necessaria perchè si manifesti l'agglutinazione.

Non è ben chiaro perchè avvenga la formazione di fiocchetti e del precipitato. Deve escludersi l'ipotesi di una alterazione della membrana batterica, la quale, secondo alcuni, diverrebbe appiccaticcia e sarebbe causa del rimanere i diversi corpi batterici come accollati fra loro: non è stato mai possibile dimostrare alcuna simile alterazione. Secondo Bordet si tratterebbe di una mutata attrazione molecolare, quale si osserva in una sospensione di caolino allorchè vi si aggiunge una piccola quantità di cloruro di sodio; tale mutamento di attrazione sarebbe nei batteri causato dall'azione delle agglutinine specifiche. Queste ipotesi però in fondo spiegano soltanto la fase visibile del fenomeno, non il suo intimo meccanismo.

Agglutinoidi. — Nei sieri agglutinanti invecchiati è stata dimostrata la formazione di modificazioni inattive delle agglutinine: tali modificazioni non producono più il fenomeno specifico, ma possono ancora fissarsi ai corpi batterici, e diconsi *agglutinoidi.* Facendo agire sui batteri un siero contenente solo agglutinoidi, non solo notasi la mancanza dell'agglutinazione, ma separando i corpi stessi per centrifugazione e decantazione, lavandoli, e risospendendoli in una diluzione attiva di siero agglutinante specifico, si riconosce che essi non sono più agglutinati da questo. Bisogna quindi ammettere che gli agglutinoidi, inattivi, hanno per il corpo batterico una avidità maggiore delle agglutinine attive; per analogia coi protossoidi diconsi *proagglutinoidi.* In alcuni sieri possono coesistere proagglutinoidi ed agglutinine: tale coesistenza pro-

duce il così detto fenomeno paradosso, consistente nella mancanza dell'agglutinazione allorchè il siero è molto concentrato, e nella sua comparsa allorchè il siero è molto diluito.

Così, per esempio, un siero antitifoso può non agglutinare il B. del tifo nelle diluzioni 1:10-1:20-1:50, mentre lo agglutina nelle diluzioni 1:100-1:200: uelle prime diluzioni vuol dire che i proagglutinoidi trovansi in sufficiente concentrazione per fissarsi ai corpi batterici e sottrarli tutti all'azione delle agglutinine attive, laddove nelle diluzioni maggiori, essendo assai scarsi, lasciano la massima parte dei corpi batterici sotto l'influenza efficace delle agglutinine. Il fenomeno paradosso può osservarsi anche in sieri freschi di malati di tifo o di febbre mediterranea (De Blasi) e può dar luogo ad errori diagnostici.

Reazioni di gruppo. — Gli agglutinogeni di una stessa specie batterica non sono tutti identici. Possiamo nel più semplice dei casi immaginare che una data specie possieda due tipi di agglutinogeni, α e β; che un'altra ne possieda altri due, γ e δ; che una terza abbia agglutinogeni dei tipi β e γ. I sieri agglutinanti specifici per queste tre specie conterranno agglutinine rispettivamente dei tipi *a* e *b*, *g* e *d*, *b* e *g*. Ne risulta che il primo siero agglutina intensamente la prima specie, non la seconda; ma, contenendo esso agglutinine del tipo *b*, avrà anche una certa azione sulla terza specie; similmente il secondo siero avrà azione sulla seconda specie non sulla prima, ma, contenendo agglutinine del tipo *g*, avrà azione anche sulla terza specie.

Si chiamano *coagglutinine* o agglutinine parziali quelle cui un siero deve la proprietà di agglutinare non solo il germe che ha esercitato l'azione antigena nell' organismo immunizzato (germe omologo), ma anche altri germi (germi eterologhi) aventi con esso qualche tipo di agglutinogeni comune: dicesi *reazione di gruppo* la comunanza del fenomeno.

Dato un siero che agglutini due germi diversi, per esempio il B. del tifo ed un B. paratifoso, può risolversi il quesito per quale di essi l'azione sia dovuta alle sole coagglutinine, eseguendo la prova di Castellani, nel seguente modo. In cmc. 0.5-1 di siero si stemperano 4-8 grosse anse di agarcoltura fresca di B. del tifo; altrettanto si fa col B. paratifoso in ugual quantità di siero. Le miscele si tengono 12 ore in termostato; poi 12-24 ore in ghiacciaia, dove il siero si chiarifica. All'azione del siero tolto dal tubo dov'era stato aggiunto il B. del tifo si sottopone il B. paratifoso, preso da una fresca agarcoltura, e viceversa all'azione dell'altro siero si assoggetta il B. del tifo.

Se il siero in esame proviene da un tifoso, il B. paratifoso non sarà più agglutinato dal siero che è stato a contatto del B. del tifo e che quindi è stato privato di tutte le sue agglutinine, principali e parziali, mentre il B. del tifo viene ancora agglutinato dal siero che è stato a contatto col B. paratifoso, e che quindi è stato privato delle coaggluti-

nine ma non delle agglutinine principali, attive esclusivamente sul B. del tifo.

Se il siero proviene da un malato di paratifo, avverrà il contrario.

Se il siero viene da un malato d'infezione mista, allora l'uno e l'altro germe saranno ancora agglutinati dopo la prova dell'assorbimento.

Agglutinazione e precipitazione. — La precipitazione è un fenomeno simile all'agglutinazione: essa avviene allorchè un siero antibatterico agglutinante è mescolato con una sospensione di polvere batterica, o anche con filtrati di brodocolture del germe omologo (Kraus).

Le precipitine batteriche possono considerarsi identiche o affini alle agglutinine.

Fischer applicò questo principio adoperando per la sierodiagnosi del tifo, in vece delle colture, estratti batterici, che si prestano bene allo scopo, e vanno sotto il nome di tifodiagnostico. Parecchi Istituti sieroterapici mettono in commercio preparati consimili, utilissimi nella pratica medica.

Agglutinine e precipitine possono ottenersi anche da altri elementi che non siano batterici, mediante l'immunizzazione di animali adatti.

Si dimostrano essenzialmente nello stesso modo delle agglutinine o precipitine batteriche: per i particolari v. p. 1318 e seg.

Ricordiamo le emagglutinine, e le precipitine per il latte, per le carni, per le proteine dei sieri normali. Le emagglutinine possono ottenersi anche immunizzando gli animali con emazie riscaldate a 115° (Bertarelli).

Lisinogeni e lisine.

Fra gli antigeni batterici hanno grande importanza quelli che provocano la formazione di batteriolisine, e diconsi perciò lisinogeni. Le principali batteriolisine conosciute sono quelle per il B. del tifo e per i bacilli paratifosi, le quali si riscontrano anche nel siero dei malati, e quelle, ancora più caratteristiche, per il vibrione del colera. Per pochi altri germi, e sopra tutto per il B. del carbonchio, si conoscono anche delle batteriolisine naturali, esistenti cioè nel siero normale.

Per ottenere le batteriolisine si immunizzano gli animali con batterî vivi od uccisi, o con i loro prodotti; anzi ricordiamo come Pfeiffer riteneva in passato che le endotossine inoculate negli animali non provocassero già la formazione di antiendotossine, ma solo di batteriolisine. Un metodo efficacissimo per ottenere un siero fortemente batteriolitico è quello di inoculare una sola volta, secondo Friedberger e Moreschi, una minima quantità di fresca agarcoltura, trasformata in vaccino, per via intravenosa: questi autori hanno infatti visto che minime dosi di vaccino antitifoso producono lo stesso effetto che dosi 4000 volte maggiori per ciò che concerne l'azione lisinogena.

Fenomeno della batteriolisi. — Abbiamo detto come si eseguisce la prova di Pfeiffer per lo studio della batteriolisi (v. pag. 1320): ora diciamo in che consiste il fenomeno, scegliendo l'esempio del V. del colera. Prelevando una goccia di essudato peritoneale da una cavia inoculata con siero specifico e vibrioni 20-30 minuti avanti, ed osservandola in goccia pendente, si nota che non vi sono più vibrioni mobili, rarissimi sono i liberi, quasi tutti sono uniti in più o meno grossi accumuli e disgregati in piccoli granuli: perciò dicesi il fenomeno anche disgregazione granulare dei vibrioni. I granuli risultanti dalla batteriolisi vengono poi incorporati dai fagociti, scomparendo così del tutto dal liquido peritoneale: il fenomeno si compie dentro un'ora al più tardi. *In vitro* la batteriolisi si svolge nello stesso modo.

Costituzione delle batteriolisine. — Ricordiamo ora quanto è necessario per intendere la costituzione delle batteriolisine.

Un siero batteriolitico fresco produce anche *in vitro* il fenomeno specifico; se è riscaldato a 56° per mezz'ora diventa inattivo *in vitro*, ma è ancora attivo *in vivo*; se al siero riscaldato si aggiunge un po' di siero normale fresco, che per sè non abbia alcuna azione, il potere batteriolitico si ripristina interamente anche *in vitro*.

Il fenomeno è dunque dovuto al concorso di due sostanze diverse, delle quali una è termostabile e rappresenta la parte specifica, l'altra è termolabile e rappresenta la parte non specifica. Quella che suole chiamarsi batteriolisina è perciò una sostanza composta di una parte specifica, che è il vero anticorpo, e di una parte non specifica; la prima si chiama sensibilizzatrice, ambocettore, desmone, copula, immuncorpo, fissatore; la seconda dicesi alessina, complemento, citasi. Noi useremo i termini ambocettore e complemento, seguendo la nomenclatura di Ehrlich, secondo il cui concetto la sostanza specifica si fisserebbe da una parte al protoplasma batterico e dall'altra al complemento, onde il suo nome di ambocettore.

Secondo quel che abbiamo detto, il complemento trovasi nel siero fresco normale di vari animali; ma bisogna soggiungere che vi sono diversi complementi e sono di natura diversa, talchè alcuni possono integrare un dato ambocettore litico, altri no. Conoscendo questo fatto, si comprende come, per eseguire irreprensibili esperienze di batteriolisi, occorra scegliere opportunamente il complemento.

Il seguente specchietto informa sulla scelta dell'animale che deve fornire il complemento per integrare alcuni tipi di ambocettori.

Batteriolisine per il	Ambocettore proveniente da	Complemento di
V. del colera	capra	coniglio
V. di Metschnikoff	pollo	piccione
	oca	piccione, coniglio, capra
B. della dissenteria	cavallo	cavallo, uomo
B. del tifo	uomo	coniglio
	coniglio	capra
	cane	cavia
	asino, cavallo	coniglio

Proprietà degli ambocettori. — Gli ambocettori batteriolitici compaiono anch'essi, come gli altri anticorpi, improvvisamente nel siero dell'animale immunizzato; il periodo di latenza è di 3-4 giorni.

Degli ambocettori batteriolitici per il vibrione del colera contenuti nel siero della capra immunizzata è noto, per le ricerche di Pick, che sono legati interamente alla euglobulina.

Come abbiamo già detto, gli ambocettori batteriolitici sono termostabili e si conservano per lunghissimo tempo nei sieri chiusi in pipetta e tenuti in ghiacciaia.

Storno del complemento. — Perchè il fenomeno avvenga nella sua pienezza è necessario che l'ambocettore e il complemento si trovino in convenienti rapporti quantitativi. Ciò fu dimostrato da Neisser e Wechsberg, i quali, studiando il potere batteriolitico del siero di un coniglio immunizzato verso il vibrione di Metschnikoff, riconobbero che, tenendo fissa la quantità di complemento e variando quella dell'ambocettore, il fenomeno manca là dove l'ambocettore trovasi più concentrato e manifestasi soltanto dove è più diluito.

Gli autori interpretano questo fenomeno, che dicesi storno del complemento, ammettendo che, dove gli ambocettori sono in eccesso, solo una parte di essi viene fissata dai vibrioni, mentre la maggior parte resta libera e si appropria tutto il complemento, sottraendolo agli ambocettori assorbiti dai corpi batterici; bisogna naturalmente anche ammettere che gli ambocettori liberi abbiano per il complemento una avidità maggiore di quelli combinati.

Con questo fenomeno paradosso di Neisser e Wechsberg non va confuso quello che si ottiene aggiungendo ad un completo sistema litico un siero anticomplementare, quale si ottiene da un'animale immunizzato col siero complementare fresco. Il siero anticomplementare conterrebbe una sostanza specifica atta a combinarsi col complemento, sottraendolo all'ambocettore: tale sostanza dicesi appunto anticomplemento.

Se non che dagli studi di Moreschi risulta che parecchie, se non tutte, le così dette azioni anticomplementari, sono dovute a ben altro fatto che alla presenza di un reale anticomplemento.

Allorchè in un liquido si produce un precipitato, il precipitato, in quanto è tale, sempre si appropria il complemento: ora, se ad un sistema litico si aggiunge un presunto siero anticomplementare, questo darà col siero normale, che rappresenta il complemento, un precipitato il quale naturalmente fissa il complemento stesso.

Oltre che dai rapporti quantitativi fra ambocettore e complemento, l'azione batteriolitica può essere influenzata anche da altre circostanze; così, per esempio, Ottolenghi ha visto che essa è indebolita allorchè ai sieri si aggiungono piccole quantità di acido lattico o di ammoniaca, e, per ciò che spetta al siero anticolerico, l'indebolimento è dovuto ad impedita sensibilizzazione dei vibrioni.

Circa l'applicazione pratica delle batteriolisine a scopo diagnostico, vedi specialmente il capitolo sul V. del colera.

Emolisine. — Come le batteriolisine sono costituite le emolisine, che appartengono ad un gruppo generico detto delle citolisine, ottenute immunizzando gli animali con vari tipi di cellule.

Benchè l'argomento non sia propriamente batteriologico, pure se ne fa cenno perchè lo studio delle emolisine ha molto contribuito a chiarire la natura delle batteriolisine. Belfanti e Carbone dimostrarono che mentre il siero di un cavallo normale è innocuo per il coniglio, quello di un cavallo immunizzato con sangue di coniglio ha per questo animale uno straordinario potere tossico specifico, più propriamente emotossico, ed inoculato in minime dosi nelle vene produce la morte. Bordet provò che il potere emotossico o emolitico del siero specifico si può dimostrare *in vitro* (v. pag. 1324) e che l'emolisina è costituita di ambocettore e complemento, nè più nè meno come le batteriolisine.

In generale si possono ottenere emolisine immunizzando un animale con sangue eterogeneo.

Il coniglio fornisce un ottimo siero emolitico se è immunizzato con sangue di bue o di pecora: l'immunizzazione si fa inoculando sotto cute, per 3-4 volte, con intervalli di 6-7 giorni, 2-3 cmc. di poltiglia corpuscolare lavata e sospesa in pari volume di soluzione fisiologica sterile: il salasso si fa 5-6 giorni dopo l'ultima inoculazione.

Tropinogeni e tropine.

Wright e Douglas dimostrarono che il siero fresco normale, mescolato con leucociti vitali e con alcune specie di batteri, per es., stafilococchi, si ottiene una fagocitosi intensa, che non si osserva in assenza di siero: tale azione fautrice della fagocitosi fu attribuita dagli autori alla presenza di sostanze speciali, che nominarono *opsonine*. Esse restano

distrutte per un riscaldamento di un'ora a 60°, scompaiono presto dai sieri conservati anche in ghiacciaia, ed agiscono non sui leucociti stimolandoli, ma sui batteri rendendoli più facile preda ai leucociti. Ciò si arguisce dal fatto che, mentre il siero riscaldato a 60° e poi aggiunto ai leucociti e ai batteri è inefficace, facendo invece agire prima il siero sui batteri, e poi riscaldando la mescolanza prima di aggiungere i leucociti, la fagocitosi avviene.

In alcuni processi infettivi il potere opsonico del siero diminuisce, mentre può essere notevolmente aumentato in quello dei convalescenti.

Neufeld e Hüne, Neufeld e Rimpau dimostrarono consecutivamente la presenza di sostanze, simili per gli effetti alle opsonine, ma diverse per alcune proprietà, nel siero degli animali immunizzati col B. del tifo, coi batteri paratifosi, con gli streptococchi, ecc.

Tali sostanze sono termostabili e si conservano per molti mesi inalterate nei sieri tenuti in ghiacciaia: furono denominate *batteriotropine* e considerate come prodotti di reazione cellulare a speciali antigeni, detti *tropinogeni*.

Non è qui il caso di discutere se per avventura le opsonine non siano altro che batteriotropine normali. Considerando che hanno uno stesso meccanismo d'azione e producono lo stesso effetto, e data la strettezza dello spazio, ci sembra conveniente trattarle insieme.

Per determinare il potere opsonico, o vogliamo dire batteriotropo, di un siero, possiamo servirci del metodo di Wright o di quello di Neufeld.

Abbiamo già visto come si allestiscono le miscele e come si fanno i preparati per studiare la fagocitosi (v. p. 1321): i risultati della numerazione dei leucociti e dei batteri ci forniscono delle cifre per le quali si può comparare il potere opsonico di un siero con quello di un altro. Facendo il rapporto fra il numero dei germi incorporati nei leucociti ed il numero di questi, si ha il così detto indice fagocitario: se per un dato siero si sono contati 100 leucociti, ed in essi 500 batteri in tutto, l'indice fagocitario corrispondente è di 500 : 100 = 5. L'indice fagocitario di un siero qualsiasi va confrontato con quello di un siero normale: il rapporto fra i due indici fagocitari dicesi indice opsonico. Così per esempio, supponendo che per un siero normale l'indice fagocitario, determinato contemporaneamente e nelle medesime condizioni che per il siero in esame, sia di 2, il rapporto 5 : 2 = 2. 5 rappresenterà l'indice opsonico.

Un siero sarà tanto più ricco di opsonine quanto maggiore sarà il suo indice opsonico. Questo è il metodo di Wright.

Il metodo di Neufeld consiste invece nell'usare varie diluzioni di siero, 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, ecc., e nel ricercare fino a qual diluzione il siero è ancora capace di promuovere una fagocitosi evidente, superiore a quella che i leucociti compiono in assenza di siero: il potere batteriotropo è misurato dalla massima diluzione attiva.

L'efficacia di alcuni sieri antibatterici oggi è attribuita al loro contenuto di batteriotropine. Le batteriotropine si possono trovare, in un

medesimo siero, insieme con le agglutinine e con gli ambocettori batteriolitici, senza per questo aver mai alcun rapporto con essi: possono infatti abbondare dove gli altri anticorpi nominati scarseggiano o fanno difetto, e viceversa (Neufeld).

Aggressine ed antiaggressine.

Sappiamo già che cosa intendesi col nome di aggressine, ed abbiamo visto che si riscontrano tanto negli essudati peritoneali, secondo Bail, quanto in alcuni estratti batterici preparati *in vitro* da colture artificiali, secondo Citron : si distinsero anzi, con questo criterio, le aggressine naturali dalle aggressine artificiali, senza che per questo s'intendessero di natura differente.

La spiegazione del potere aggressinico degli essudati o degli estratti fu spiegata dal Bail con l'esistenza di prodotti di secrezione batterica, atossici per sè stessi, ma capaci di tener lontani i leucociti dal campo d'infezione, quindi utili ai batteri per potersi indisturbatamente moltiplicare. Citron invece pensa che il potere aggressinico è dovuto a tutt'altro meccanismo: tanto negli essudati quanto negli estratti esistono particelle di protoplasma batterico, le quali inoculate nell'organismo fissano gli anticorpi normali di cui esso è provvisto, impedendo così che questi agiscano sui batteri viventi, i quali perciò possono più rapidamente ed intensamente proliferare che in un animale in cui siano stati introdotti senza aggiunta di liquidi aggressinici.

Qualunque sia il meccanismo d'azione delle aggressine, è certo che i liquidi così detti aggressinici hanno proprietà immunizzatorie, ossia antigene.

I sieri degli animali immunizzati in tal modo hanno proprietà antibatteriche, ed impediscono l'infezione in animali inoculati con dosi letali dei rispettivi batteri: si chiamano sieri antiaggressinici, ammettendo che vi siano delle sostanze speciali, dette *antiaggressine*.

Ma tale ipotesi non ha fondamento : è stato provato che tali sieri o sono antitossici, più o meno debolmente, o batteriolitici, o batteriotropi, o l'una e l'altra cosa insieme. Sopra tutto si dimostrano batteriotropi, in maniera specifica, come è stato provato per varie specie batteriche (Weil e Tsuda, De Blasi).

Fissazione del complemento.

Bordet e Gengou, partecipando vivamente alla disputa circa la unicità o pluralità del complemento, immaginarono nel 1901 per sostenere la prima ipotesi un'esperienza ingegnosissima, sulla quale sono fondati parecchi dei più importanti metodi diagnostici moderni, come la reazione di Wassermann e quella di Ghedini o di Weinberg e Parvu, ed altre applicazioni pratiche.

Il concetto originario della reazione è il seguente: si abbiano da una parte dei corpi batterici sensibilizzati, cioè carichi di ambocettore batteriolitico specifico, e dall'altra delle emazie, pure sensibilizzate, cioè cariche di ambocettore emolitico specifico: se aggiungiamo del complemento al primo sistema, lasciandovelo a contatto per un'ora, il complemento verrà fissato dall'ambocettore batteriolitico ed allorchè, in un secondo tempo, vi aggiungiamo il secondo sistema, la dissoluzione delle emazie mancherà, perchè l'ambocettore emolitico non viene integrato.

In esperienze fatte sulla guida di questo raziocinio bisogna naturalmente scegliere il complemento adatto, che è dato in genere dal siero fresco normale di cavia. In luogo dei corpi batterici, come fecero Bordet e Gengou, si possono con vantaggio adoperare i loro estratti, ottenuti sia col metodo del riscaldamento prolungato per parecchie ore a 60°, sia con quello dello scotimento.

Si è visto poi che il fenomeno di Bordet e Gengou si ha pure quando al sistema *batteri + ambocettore* si sostituisce un sistema *precipitogeno + precipitina*, per esempio un'albumina eterogenea col suo siero precipitante specifico (Moreschi); ed allora si è pensato che anche la fissazione del complemento operata da batteri o estratti batterici a contatto di siero specifico non sia operata dall'ambocettore litico, ma da una precipitina legata al precipitogeno batterico, cioè da un precipitato specifico. In favore di questa ipotesi sta il fatto che il fenomeno di Bordet e Gengou avviene anche con sieri antibatterici specifici che non contengono ambocettori litici. È ben vero che di precipitati nel sistema *batteri + siero specifico + complemento* per lo più non se ne vedono, ma si può rispondere che non occorre che siano tali nel senso ordinario della parola, bastando per fissare il complemento la semplice unione *precipitogeno + precipitina*, senza formazione di precipitato visibile.

In ogni modo, si può convenire col Citron di chiamare *reagine* le sostanze che si trovano nel siero specifico e che a contatto coi rispettivi *reaginogeni* batterici dànno il fenomeno di Bordet e Gengou: con ciò si lascia impregiudicata la questione della loro identità o meno rispettivamente con le precipitine ed i precipitogeni.

La reazione è stata dimostrata per il B. della peste rispetto al siero antipestoso di cavallo, per il vaccino anticarbonchioso rispetto al siero di cavia immunizzata, per il B. del tifo rispetto al siero di cavia immunizzata ed al siero di convalescenti di tifo, per il B. della tubercolosi rispetto al siero di malati e di cavie immunizzate, per il B. della pertosse rispetto al siero di malati di pertosse, per il meningococco rispetto al siero di convalescenti di meningite, e per qualche altro germe.

La reazione di Wassermann per la sifilide è tecnicamente modellata su quella di Bordet e Gengou. Essa però non è immunitariamente specifica, riuscendo positiva, abbastanza spesso, anche col siero dei leprosi, dei malarici in atto, degli scarlattinosi in atto o in convalescenza, dei malati di framboesia tropicale. D'altra parte come antigene, ossia reagi-

nogene, possono servire non soltanto gli estratti di fegato di un eredo-sifilitico, ma anche quelli di alcuni fegati normali, quelli del cuore di cavia; e non soltanto gli estratti acquosi, ma anche gli alcoolici.

Con tutto ciò l'importanza diagnostica della reazione di Wassermann non resta pregiudicata, sopra tutto nei nostri climi, anche perchè le malattie che la possono dare positiva, la dànno solo temporaneamente, ed oltre a ciò sono per sè stesse diagnosticabili con altri mezzi sicuri.

Circa la natura dei reaginogeni e delle reagine che hanno azione nella prova di Wassermann, si conosce quanto segue. I reaginogeni sono di natura lipoide, tanto vero che Sachs e Rondoni proposero di sostituire agli estratti secondo Wassermann una sospensione di vari lipoidi conosciuti, in proporzione costante. Le reagine sono legate alle globuline, come primi hanno dimostrato Micheli e Borelli, e precisamente alla pseudoglobulina (Levi della Vida).

Anafilassi.

È questo un fenomeno importante per sè stesso, ed anche perchè gli studi fatti su esso hanno illustrato parecchi punti oscuri circa varî sintomi morbosi e speciali reazioni che si osservano in alcune malattie d'infezione. Gli studi di von Pirquet e Schick sulla malattia da siero, quelli di von Pirquet sui fenomeni della rivaccinazione, quelli di Richet sulle così dette congestine, ed altri non pochi hanno dischiuso questo nuovo campo di studi.

Ricordiamo anzi tutto i fatti principali che hanno indotto a riconoscere nell'organismo quello stato di ipersensibilità ad alcune sostanze, che va sotto il nome di anafilassi o di allergia.

Malattia da siero. — In alcuni pochi individui per effetto di una sola iniezione di siero antidifterico, in un numero assai maggiore soltanto dopo una reiniezione, si manifestano dei sintomi caratteristici: forte edema nei punti d'inoculazione, edemi anche negli arti e nella faccia, tumefazioni ghiandolari, artralgie, esantemi per lo più del tipo dell'urticaria, febbre. Questi sintomi durano per alcuni giorni e poi si dileguano a poco a poco. Allorchè la malattia si manifesta in individui inoculati la prima volta, il periodo d'incubazione è di 8-12 giorni (reazione normale); quando compare in individui reinoculati oltre il sesto mese dopo la prima iniezione, l'incubazione è di 5-6 giorni (reazione accelerata); quando la seconda inoculazione è fatta 12-40 giorni dopo la prima, si ha un'esplosione rapida, quasi immediata, dei sintomi, i quali sogliono inoltre essere più gravi (reazione immediata).

La causa della malattia non è l'antitossina contenuta nel siero, ma il siero di cavallo per sè stesso, cioè la sua albumina.

Fenomeno di Arthus. — Se in un coniglio sotto cute s'inocula più volte del siero di cavallo, mentre dopo le prime iniezioni manca qual-

siasi evidente reazione, già dopo la 4ª o la 5ª si manifestano edemi locali, infiltrazioni e necrosi cutanee profonde. Il fenomeno è specifico, perchè queste lesioni mancano del tutto se, invece di iniettare siero di cavallo la 4ª o 5ª volta, s'inietta siero di un altro animale.

Se la 4ª o 5ª inoculazione di siero di cavallo si fa nelle vene, non sotto cute, avviene spesso rapidamente la morte dell'animale con dispnea, diarrea, crampi e paralisi.

Fenomeno di Smith. — Se in una cavia che sia stata alcun tempo prima utilizzata per titolare del siero antidifterico, che quindi abbia ricevuto sotto cute una miscela innocua di veleno difterico e siero, si fa una seconda inoculazione della stessa miscela, l'animale soccombe rapidamente in pochi minuti o in qualche ora, mostrando prima grande irrequietezza, strofinandosi spesso il muso colle zampe, poi abbattendosi nella gabbia: allora vomita, emette feci ed urina, è tormentato da crampi; finalmente cade sul fianco, irrigidisce la nuca piegando indietro il capo, e muore traendo pochi profondi respiri.

Congestine di Richet. — Richet estrasse dai mitili e dalle attinie delle sostanze cui pose nome di congestine, le quali sono tossiche per il cane.

Inoculando nella safena dei cani dòsi subletali di congestina, dopo breve tempo si produce del vomito. Se si lasciano riavere gli animali, e dopo alcuni giorni si cerca di stabilire la minima dose emetica della congestina, si vede che essa è ridotta ad $^1/_4$-$^1/_5$ della dose iniziale. Se invece di fare il confronto fra le dosi emetiche, si fa tra le dosi letali, si vede che negli animali precedentemente inoculati con dosi subletali la dose letale è 10 volte minore di quella che occorre per uccidere dei cani non trattati; non solo, ma i sintomi compaiono immediatamente (vomito, dispnea profonda, paralisi) e la morte avviene in 12-24 ore.

Considerazioni. — Tutti i fatti brevemente riferiti hanno questo di comune: che, introducendo nell'organismo animale, per via parenterica, delle sostanze proteiche eterogenee, si conferisce uno stato di ipersensibilità specifica, più o meno forte, verso le medesime sostanze. Bisogna dunque ammettere che per effetto della prima inoculazione dev'essere avvenuta nell'organismo qualche modificazione. Richet pensa, per chiarire i fenomeni prodotti dalle congestine, che nel siero degli animali una volta inoculati producesi una sostanza, cui ha posto nome di *tossogenina*, la quale trovandosi, dopo la seconda inoculazione, in presenza di nuova congestina, la decomporrebbe, rendendone subito libere delle sostanze con azione tossica acutissima. Per illustrare meglio il suo concetto egli paragona la tossogenina ad un fermento, cioè alla emulsina, che agendo sull'amigdalina, per sè inattiva, ne rende libero il velenosissimo acido cianidrico. Dal concetto di Richet non si discostano molto quello di Besredka, che ha proposto per le sostanze che si formano nel

siero il nome di *sensibiline*, e quello di Otto, che le ha chiamate più genericamente *corpi reattivi anafilattici*.

Importante è che lo stato anafilattico può essere conferito agli animali passivamente; e ciò conferma che l'anafilassi è dovuta ad un corpo nuovo formatosi nell' organismo inoculato. Ora, avendo presente che i fenomeni anafilattici si hanno per introduzione parenterica di proteine ossia di albumine eterogenee, e che d'altra parte queste provocano la formazione di precipitine specifiche, fu supposto da Friedberger che il corpo reattivo anafilattico non fosse altro che una precipitina. Fu infatti osservato un certo parallelismo fra precipitina e corpo reattivo anafilattico (Doerr, Russ e Moldovan): le osservazioni addotte in contraddizione ai risultati di questi autori furono dimostrate insufficienti per la non troppa cura dei rapporti quantitativi, che hanno in siffatti fenomeni importanza grandissima (Friedberger e Vallardi). Fu inoltre visto che nell'animale sensibilizzato il complemento viene fissato dalla sostanza inoculata e dal corpo reattivo, tal quale esso è fissato *in vitro* dai precipitati specifici.

Possiamo dire, dopo la conoscenza di questi fatti, che la sostanza inoculata funge da antigeno, il quale dicesi *anafilattogeno*, ed il corpo reattivo di Otto ha valore di anticorpo e dicesi *anafilattina*.

Dai numerosi ed amplissimi studî di Friedberger e dei suoi collaboratori, la sostanza tossica che è causa dei sintomi anafilattici deriva dall'azione del complemento sull'anafilattogeno e l'anafilattina insieme: la sostanza tossica che se ne origina chiamasi *anafilatossina*. L'anafilatossina può ottenersi *in vitro*, facendo digerire per più ore dal siero fresco normale un precipitato specifico precedentemente ben lavato: l'inoculazione dell'anafilatossina artificiale produce direttamente negli animali nuovi i sintomi anafilattici.

Secondo Kraus e Biedl l'intossicazione anafilattica è identica alla intossicazione da peptone Witte inoculato per via parenterica: tale asserzione è confortata da Pfeiffer e Mita, che dimostrarono nell'anafilatossina prodotti di demolizione delle proteine, i quali avevano caratteri di peptoni.

Reazione tubercolinica. — La ipersensibilità dei tubercolosi alla tubercolina può essere interpretata in modo simile agli altri stati d'anafilassi, benchè vi siano altre teorie sodisfacenti per la sua spiegazione, le quali sarebbe troppo lungo riferire e discutere. Allorchè s'inocula della tubercolina in malati di tubercolosi, essa funge da anafilattogeno, e trovandosi in presenza di anafilattina (anticorpo provocato dal B. tubercolare nell'organismo), vi si combina e fissa il complemento: si liberano così da questo complesso le sostanze tossiche specifiche le quali dànno la reazione tubercolinica. L'anafilattina o antitubercolina è, secondo Wolff-Eisner, un ambocettore litico. E' importante, sotto questo aspetto, che Aronson potè ottenere artificialmente *in vitro* tali sostanze tossiche, facendo digerire da siero di cavia normale i bacilli della tubercolosi.

Reazione meiostagminica.

Quando gli antigeni reagiscono coi rispettivi anticorpi, si originano delle sostanze facilmente diffusibili, sconosciute nella loro natura chimica, le quali hanno influenza sulla tensione superficiale del liquido in cui la reazione si svolge: per conseguenza varia la grandezza delle gocce che il liquido è capace di dare cadendo da un tubo capillare, o, che vale lo stesso, cambia il numero delle gocce che compongono l'unità di volume.

Nella tecnica abbiamo visto come questo mutamento fisico-chimico si dimostri mediante lo stalagmometro di Traube.

Precisando il fatto, diremo che la tensione superficiale del liquido, dopo che è avvenuta la reazione fra antigene ed anticorpo, viene abbassata, onde, la grandezza delle gocce essendo divenuta minore, il loro numero aumenta rispetto al valore iniziale trovato subito dopo mescolati i due reattivi.

Le sostanze che si producono o si liberano durante la reazione fra antigene ed anticorpo, sono state chiamate meiostagmine appunto perchè fanno diminuire (μείων = minore) la grandezza delle gocce (στάγμα = goccia).

La reazione meiostagminica è in generale specifica come la neutralizzazione degli antigeni e degli anticorpi, della quale essa non è che una conseguenza: può quindi essere utilizzata a scopo diagnostico.

La differenza fra il valore terminale ed il valore iniziale del numero delle gocce è di 2-4-6-8: anche quando tale differenza o scarto è di sole due gocce, è però sempre di parecchio fuori dei limiti dell'errore massimo possibile, che è di $^1/_9$ o $^2/_9$ di goccia, ed è sempre maggiore di quello che si osserva con sieri normali.

Nulla val meglio, per chiarire la cosa, che dare un esempio concreto, che togliamo da un lavoro dell'Ascoli, ideatore della reazione.

In questo esempio la reazione è avvenuta per la unione di uno o forse più antigeni, rappresentati da un estratto di corpi del B. del tifo, e di uno o più anticorpi specifici esistenti nel siero di un tifoso. Per confronto riportiamo anche i dati relativi ad un'esperienza fatta con antigene tifoso e con un siero normale.

I. Esperienza con siero tifoso	Numero delle gocce determinato subito	Numero delle gocce determinato dopo 2 ore di permanenza a 37° C.
9 cmc. di siero diluito 1 : 10 + 1 cmc. di estratto diluito 1 : 1,000	57 57.1	58 58
Id. id. + id. id. 1 : 10,000	58 58.1	61.2 61.1
Id. id. + id. id. 1 : 100,000	58.2 58.1	60 60
Id. id. + id. id. 1 : 1,000,000	58 57.9	59.1 59.2
Id. id. + 1 cmc. di soluzione *NaCl* 0.85 %	57.4 57.3	58.5 58.5

II. Esperienza con siero normale	Numero delle gocce determinato subito	Numero delle gocce determinato dopo 2 ore di permanenza a 37° C.
9 cmc. di siero diluito 1 : 10 + 1 cmc. di estratto diluito 1 : 1,000	57.1 57.2	58 58.1
Id. id. + id. id. 1 : 10,000	57.1 57	58.2 58
Id. id. + id. id. 1 : 100,000	57.1 57.1	58 58
Id. id. + id id. 1 : 1,000,000	57.1 57	58 57.9
Id. id. + 1 cmc. di soluzione *NaCl* 0.85 %	57.1 56.9	58 58.1

La reazione meiostagminica è stata ricercata e trovata positiva nel tifo, nella tubercolosi, nella sifilide, nell'anchilostomiasi, nell'echinococcosi, nei tumori maligni (Ascoli, Izar, Micheli e Cattoretti, Stammler ed altri).

È però da avvertire che in alcune di queste malattie la reazione non è strettamente specifica, potendo avvenire talora con sieri di malati differenti, ciò che per altro non ne diminuisce il valore diagnostico.

La parte che negli antigeni ha importanza per la reazione è rappresentata dai lipoidi, come implicitamente è provato dal fatto che gli antigeni si preparano mediante estrazione con alcool od etere o altri solventi di lipoidi (v. p. 1328).

Riassunto generale sugli antigeni ed anticorpi.

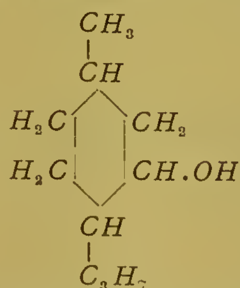
È stato già detto, a proposito delle tossine ed antitossine, che queste sono prodotti di reazione cellulare: lo stesso può ripetersi per tutti gli altri anticorpi, sia che essi corrispondano ad antigeni batterici, sia che corrispondano ad antigeni di tutt'altra provenienza, cioè a cellule di organismi superiori o a semplici proteine.

Ehrlich immaginò una teoria, detta teoria delle catene laterali, atta a spiegare il modo di formazione degli anticorpi, la loro specificità, il loro meccanismo d'azione: teoria ricca quant'altra mai di conseguenze logiche, per convalidare o contraddire le quali innumerevoli studiosi fecero esperienze diversissime, trovando fatti sempre nuovi. Tutte le più fine conoscenze che si hanno presentemente dai fenomeni immunitari sono frutto della teoria di Ehrlich, la quale quindi merita ben a ragione l'attributo di euristica, che egli stesso le diede.

Dobbiamo però ricordare che Centanni, fin dal 1893, in occasione di alcuni suoi studi sulle vaccinazioni in genere, aveva accertato dei fatti ed avanzata un'ipotesi, a cui si ricongiunge per certi rispetti la teoria delle catene laterali, posteriormente formulata.

Sopra tutto egli aveva ammesso nelle colture la esistenza di sostanze vaccinanti, prive di potere tossico, le quali, inoculate negli animali recettivi, li proteggono contro l'infezione, occupando alcuni aggruppamenti molecolari periferici del protoplasma delle cellule più sensibili alla azione di quel dato germe, ed escludendone così le sostanze tossiche, le quali altrimenti, trovando liberi quegli aggruppamenti, vi si legherebbero e danneggerebbero gli elementi cellulari. Centanni chiamò poi *stomosine* le sostanze vaccinanti e *stomositi* o *stomiti* gli aggruppamenti molecolari periferici della cellula. Le *stomosine* possono ben corrispondere ai *tossoidi* di Ehrlich, gli *stomiti* alle catene laterali.

Ehrlich ammette che il protoplasma cellullare, quindi anche quello dei batteri, sia composto di un *nucleo centrale* o funzionale, e di aggruppamenti periferici o *catene laterali*: questa concezione deriva per analogia dalla struttura dei composi ciclici della chimica organica. Per esempio, nel mentolo, che ha la formula:



il nucleo centrale è rappresentato dall'anello benzenico, e le catene laterali dall'ossidrile, dal metile e dal propile.

Questo esempio chiarisce come le catene laterali della molecola protoplasmatica possano essere diversissime. Secondo Ehrlich, hanno in condizioni normali importanza fisiologica per la nutrizione e la respirazione intracellulare: per mezzo di esse verrebbero fermate ed assicurate alla cellula le sostanze trofiche destinate alle compensazioni materiali ed energetiche.

Allorchè s'introduce una sostanza eterogenea nell'organismo, tossica od atossica, essa può trovare, ma non sempre trova, adatte catene laterali cui fissarsi: nel caso che le trovi, si fissa di fatto. Il protoplasma però cerca di liberarsi della sostanza eterogenea, ma non potendo eliminare questa soltanto, stacca da sè anche la catena laterale occupata.

Passa così in circolo il complesso *sostanza eterogenea + catena laterale.* Ma la cellula riforma la catena perduta. Se gli attacchi son molti, il numero dei complessi staccati aumenta, e le catene perdute vengono tutte rigenerate; non solo, ma vengono anche riprodotte in eccesso, per lo stato irritativo in cui si trova la cellula.

Però le catene rigenerate in eccesso vengono eliminate, rappresentando per il protoplasma come una specie di zavorra: così che, in un dato momento, si trovano in circolo, oltre un certo numero dei complessi detti di sopra, anche molte catene laterali libere.

Le sostanze eterogenee sono gli *antigeni*, le catene laterali libere in circolo sono gli *anticorpi.*

Parecchi organismi animali producono già in condizioni normali alcuni anticorpi, che si possono dimostrare nel siero: si chiamano *anticorpi naturali*, ed hanno anch'essi caratteri specifici. Così il siero dell'uomo, e più ancora quello del cavallo, contiene antitossina difterica; i sieri di coniglio, di asino, di cavallo contengono batteriolisine per il B. del carbonchio.

Considerando che le catene laterali, mentre sono ancora legate al nucleo centrale, hanno la funzione di fissare, ossia di ricevere, le sostanze che vi arrivano, sono state chiamate da Ehrlich anche *recettori.* Gli anticorpi dunque non sono che recettori cellulari liberi, e conservano, anche liberi, l'attività di combinazione per i rispettivi antigeni. Il gruppo per il quale i recettori fissano gli antigeni dicesi *aptoforo*; e reciprocamente anche gli antigeni hanno il loro gruppo *aptoforo*, col quale si fissano agli anticorpi.

Negli antigeni tossici, come le tossine, oltre al gruppo *aptoforo*, bisogna ammettere il gruppo che possiede l'azione tossica specifica, e che dicesi *tossoforo* o *zimotossico.*

Come vi sono antigeni diversi, così vi sono recettori diversi, quindi anticorpi diversi.

Si distinguono tre specie di recettori, quindi altrettante di anticorpi, che si dicono del I ordine, del II ordine e del III ordine. I primi possiedono un gruppo aptoforo, e comprendono le antitossine e gli antien-

zimi: per tale gruppo questi anticorpi si fissano rispettivamente alle tossine ed agli enzimi, neutralizzandone l'azione.

I secondi possiedono un gruppo aptoforo, per il quale si fissano ai corrispondenti antigeni, ed un gruppo portatore dell'azione specifica, che dicesi generalmente zimotico; vi appartengono le agglutinine batteriche e cellulari, e le precipitine batteriche, cellulari e proteiche.

I recettori del III ordine possiedono un gruppo aptoforo col quale si fissano ai rispettivi antigeni, e che dicesi più propriamente *citofilo*, perchè gli antigeni sono rappresentati da elementi cellulari; possiedono inoltre un altro gruppo aptoforo, per il quale fissano il complemento e che perciò dicesi *complementofilo*: vi appartengono gli ambocettori batteriolitici, emolitici e citolitici in genere.

Abbiamo visto a pag. 1420 che gli ambocettori non sono attivi per sè stessi, ma hanno bisogno del complemento per agire. L'ambocettore ed il complemento, considerati come un tutt'uno, costituiscono una *lisina:* questo è il significato che spetta alle parole batteriolisina, emolisina, citolisina.

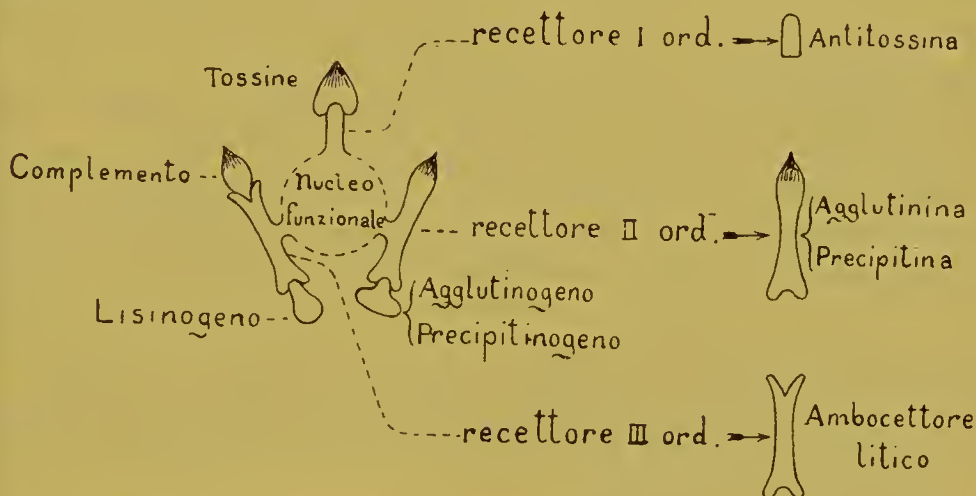


Fig. 506. — Schema figurativo di recettori ed anticorpi secondo Ehrlich.

Considerando che tutti gli anticorpi, per compiere la loro azione, devono fissarsi ai loro rispettivi antigeni, sono stati chiamati anche complessivamente *aptine*, e si distinguono in *aptine semplici* comprendenti i recettori, rispettivamente gli anticorpi, del I e del II ordine, ed *aptine complesse*, col quale nome si vogliono indicare non i recettori del III ordine, rispettivamente gli ambocettori soltanto, ma le lisine attive *in toto*, costituite come sono di ambocettore + complemento.

Il complemento, essendo considerato come il portatore dell' azione litica, deve avere, oltre al gruppo aptoforo per legarsi all'ambocettore, anche un gruppo attivo che dicesi *zimotico*.

La fig. 506 rappresenta, in forma certamente assai grossolana, i tre tipi di recettori cellulari ed i rispettivi tre anticorpi: il recettore del

I ordine appare occupato dalla tossina, il cui gruppo tossoforo è tratteggiato; il recettore del II ordine si vede occupato da un agglutinogeno o precipitogeno, ed ha il gruppo zimotico tratteggiato; il recettore del III ordine porta ad un capo il lisinogeno, all'altro il complemento col gruppo zimotico tratteggiato.

Ben s'intende che questo è un semplice schema figurativo, fatto per comodità mentale, giacchè esso è ben lungi dal rappresentare veramente come stanno le cose.

Il nucleo centrale dev'essere immaginato come risultante da complessi atomici vari e variamente legati fra loro; del pari ogni recettore corrisponde ad altri aggruppamenti atomici: ma ignoriamo assolutamente fino ad ora la loro natura.

Vi è tuttavia qualche paradigma, che può gettare un barlume di luce su questo particolare argomento, e ricordiamo in tal proposito l'esperienza di Kyes e Sachs. È noto che il cobraveleno non dissolve per sè solo i globuli rossi di alcune specie animali; ma aggiungendovi una piccola quantità di adatto siero fresco normale, si rende emolitico. Ora Kyes e Sachs hanno dimostrato che la sostanza attivatrice contenuta nel siero, e corrispondente al complemento, è un lipoide, la lecitina, corpo cristallizzabile e di nota costituzione chimica.

Tutti gli anticorpi, come tutti gli antigeni, sono in generale poco o punto diffusibili, ed hanno caratteri di sostanze colloidali.

Questo fatto che recentemente si è venuto sempre meglio illustrando non toglie però ancor nulla al valore della teoria di Ehrlich. Ad esempio, per ciò che concerne la neutralizzazione fra tossina ed antitossina, von Krogh ha recentemente dimostrato che il fenomeno s'inizia bensì come una reazione colloidale, ma poi procede come una vera e propria combinazione chimica, conforme a ciò che aveva stabilito Ehrlich.

Al lume della teoria di Ehrlich si possono soddisfacentemente spiegare tutti i fenomeni finora conosciuti nel campo dell'immunità.

Diamone qualche esempio.

1) Una conseguenza logica della teoria è questa, che le cellule produttrici di anticorpi devono essere appunto quelle più sensibili all'azione degli antigeni. Infatti, prendendo l'esempio del tetano, è noto che la tossina ha un'affinità elettiva per la sostanza nervosa centrale, il che vuol dire che in essa trova i recettori cellulari capaci di fissarla: se quindi si mescola della tossina tetanica con sostanza cerebrale e la miscela si inocula in un animale recettivo, essa deve rimanere senza effetti tossici. Tale esperienza fu fatta da Wassermann e Takaki, e riuscì conforme alla supposizione. Il fatto che dei lipoidi come la colesterina (Almagià) possono similmente neutralizzare la tossina tetanica non contraddice, anzi conforta, il risultato della precedente esperienza, sapendosi come la sostanza nervosa sia ricca di lipoidi.

2) Un'altra esperienza che conferma l'ipotesi di Ehrlich è quella di Ransom, il quale vide che inoculando forti dosi di tossina tetanica nel

piccione, pochissimo recettivo, si può riconoscere l'esistenza di tossina libera nel sangue e negli organi, non però nel sistema nervoso centrale: infatti, mentre gli animali inoculati con poltiglie dei vari organi presentavano sintomi tetanici, quelli inoculati con emulsione di sostanza cerebrale non ne presentavano. Ciò vuol dire che la sostanza nervosa, la più sensibile alla tossina, è anche la sola capace a neutralizzarla.

Per non fraintendere questi fatti bisogna però avvertire che l'azione neutralizzante spetta ai recettori in quanto sono liberi, cioè quando possono considerarsi come antitossine, mentre al contrario, finchè sono legati al protoplasma vivente, sono proprio essi la causa della fissazione del veleno, quindi dell'intossicazione.

3) Per addurre un altro esempio illustrativo della teoria di Ehrlich, vediamo come l'antitossina difterica produca i suoi effetti benefici nella difterite. Nel sangue di un difterico circola della tossina, la quale, dal luogo di produzione, tende a portarsi e fermarsi agli elementi cellulari per cui ha affinità elettiva e azione tossica. Inoculando dell'antitossina, questa incontra in circolo la tossina e la fissa neutralizzandola, prima che essa arrivi alle cellule sensibili.

S'intende come la sieroterapia antidifterica sia maggiormente efficace quanto più precocemente applicata, cioè quanto minore è il numero delle molecole di tossina che hanno già occupato il protoplasma delle cellule recettive: s'intende anche la ragionevolezza dell'uso di fortissime dosi di antitossina, quando si interviene tardivamente, quando cioè molta tossina si è già fissata alle cellule: in tal caso solo con un forte eccesso di antitossina si può sperare di strapparne una parte alle cellule cui già si è fissata.

Secondo la concezione di Ehrlich, anche la molecola del protoplasma batterico può considerarsi composta di un nucleo centrale e di catene laterali: le tossine, gli agglutinogeni, i lisinogeni, i tropinogeni, ecc., sarebbero altrettante catene laterali o recettori del protoplasma batterico.

C. — BATTERIOLOGIA SPECIALE.

I. — COCCACEE.

Vi appartengono tutte le forme rotonde o quasi, le quali si distinguono in tre generi, secondo l'aggruppamento dei singoli individui.

1. Genere *Micrococcus*. I cocchi sono irregolarmente aggruppati in forma di grappoletti, accanto ai quali inoltre si vedono quasi sempre delle coppie isolate, delle tetradi, talora perfino file di 4-5, al massimo ed eccezionalmente 6, individui. Le forme patogene sono tutte immobili.

2. Genere *Streptococcus*. I cocchi sono ordinati in catenelle più o meno lunghe e flessuose, composte di almeno 8-10 articoli, spesso di molte diecine: quando le catenelle sono assai lunghe, si presentano variamente

avvolte su sè stesse. Accanto alle catene si possono quasi sempre osservare anche rare coppie isolate. Sono tutte forme immobili, benchè alcune siano, secondo David ed Ellis, ciliate.

3. Genere *Sarcina*. I cocchi sono regolarmente ordinati in tetradi, più spesso in pacchetti di 8, 16, 32 individui. Tale disposizione si osserva nei preparati a fresco, meglio a goccia pendente, e va perduta durante le manovre che si fanno per allestire un preparato colorato. I sostrati nutritivi liquidi, principalmente l'infuso di fieno, sono i più adatti per dimostrare il caratteristico aggruppamento delle sarcine. Vi sono dèlle sarcine ciliate e mobili. Non vi appartiene alcuna forma patogena.

Micrococcus pyogenes

o Stafilococco piogeno.

Fu scoperto da Rosenbach nel 1884. È causa di flogosi, con esito frequente in suppurazione, nei più diversi tessuti ed organi; produce ascessi, flemmoni, foruncoli, acne, sicosi, idrosadenite, periostite, osteomielite, ed anche setticopiemia.

Si trova pure nell'organismo sano, sulla pelle e sulle mucose delle cavità aperte.

Si presenta in due varietà, distinte per la produzione di pigmento: il *M. p. aureus*, che dà colture di colore giallo dorato, ed il *M. p. albus*, le cui colture sono bianche. Salvo questa differenza, concordano in tutti i loro caratteri: il *M. p. aureus* suole dimostrarsi più virulento del *M. p. albus*.

Una terza varietà, assai meno importante, è il *M. p. citreus* di Passet, che si distingue per il pigmento giallo citrino.

La descrizione che segue si riferisce alle prime due varietà: le indicazioni circa il colore delle colture saranno fatte dove occorre.

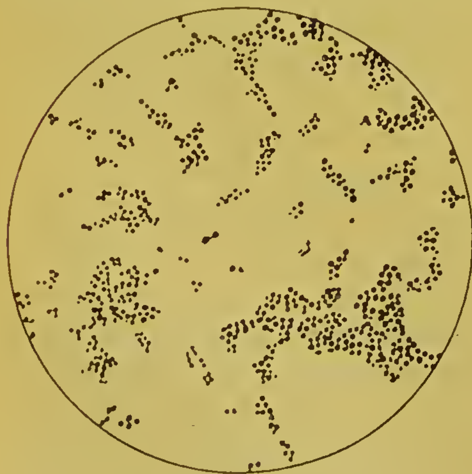


Fig. 507. — Stafilococco.

Caratteri microscopici.

Elementi rotondi, del diametro medio di 0.8 μ, uniformemente colorabili, resistenti al metodo del Gram.

Nel pus e nei tessuti malati gli aggruppamenti sono formati da pochissimi individui, 6-8, e spesseggiano le coppie isolate; nelle colture artificiali invece i grappoli possono essere composti di 15-20 e più individui. Si vedono anche degli elementi leggermente ellittici attraversati da una linea chiara, che esprime una divisione avviata (v. fig. 507)

Colture.

L'ottimo di temperatura è 37°; l'accrescimento avviene però anche tanto a temperatura di stanza, con un minimo di 6-8°, quanto a 42-43° fino a 45°.

È aerobio; ma può crescere altresì con una tensione di ossigeno inferiore ad $^1/_5$ di atmosfera.

Si coltiva facilmente nei comuni terreni di coltura, con reazione neutra o leggermente alcalina.

Colonie in agar. — Ad occhio nudo le colonie superficiali appaiono rotondeggianti, di color giallo arancio o bianco, leggermente rilevate, con lucentezza grassa, opache, del diametro di 3-4 mm. allorchè sono pienamente sviluppate. Le colonie profonde sono rotondeggianti o a cote, più piccole delle superficiali.

A piccolo ingrandimento (60-70 diametri) le superficiali dimostrano il contorno netto e regolare o quasi, la zona periferica finamente punteggiata e di color giallo scuro, la zona centrale omogenea e di color bruno. In alcune colonie si può osservare un anello più oscuro, posto dentro dalla zona marginale. Altre colonie invece hanno aspetto quasi uniforme, sono più estese, di color giallo chiaro, molto granulose, semitrasparenti. Le colonie profonde hanno per lo più forma di cote e sono opache, di color giallo grigiastro scuro o intensamente bruno.

Colonie in gelatina. — Ad occhio nudo somigliano a quelle in agar, se non che il loro contorno è alquanto ondulato, ed il diametro non oltrepassa 1-2 mm. Inoltre per la fluidificazione del sostrato, che in forma di scodella avviene intorno e sotto alle colonie, queste si vedono abbassate e circondate da un alone di gelatina liquefatta.

Anche a piccolo ingrandimento ricordano quelle in agar, ma sono di color giallo meno scuro, specialmenta alla periferia, ed hanno struttura granulosa, che è piuttosto grossolana verso il centro.

Coltura in brodo. — Si ha forte ed uniforme intorbidamento, con discreto sedimento fioccoso biancastro o giallastro, e talora con delicatissima pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, liscia, opaca, di color bianco o giallo arancio, con lucentezza grassa, con margini regolari. Acqua di condensazione coi caratteri della brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Lo stafilococco si sviluppa lungo la linea di infissione, sotto forma di un nastrino continuo, bianco-giallastro, dando fra il secondo e il terzo giorno una fluidificazione conica, che poi procede a sacco, talora quasi a cilindro. La gelatina liquefatta è torbida, piena di grumetti, dei quali un copioso accumulo di color biancastro o giallo arancio trovasi al fondo.

Vi sono stipiti che fluidificano la gelatina intensamente e rapidamente, altri debolmente e con molta lentezza.

Coltura in latte. — Lo stafilococco si moltiplica nel latte, coagulandolo in uno o due giorni, talvolta solo dopo una settimana, in forma di grossi fiocchi o in massa compatta.

Strisciamento su patata. — Patina simile a quella dell'agarcoltura, ma più rilevata, più succolenta, con superficie non perfettamente liscia, di colore biancastro o giallo arancio.

Resistenza in coltura. — Le colture dello stafilococco si conservano vitali, conservate al buio, a temperatura di stanza, per la durata di alcuni mesi.

Attività biochimiche.

Lo stafilococco scinde la glicerina, il glicosio ed il lattosio, producendo acidi, fra cui sempre trovasi l'acido lattico: accanto a questo possono dimostrarsi gli acidi propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico, citrico, secondo la qualità degli zuccheri, o idrati di carbonio in genere, che si aggiungono ai terreni di coltura. Scomponendo le dette sostanze, non produce però mai gas. Dà idrogeno solforato e poco indolo; dà anche triptofane. Si sono visti degli stipiti capaci di trasformare l'urea in carbonato ammonico.

Le colture dello stafilococco mandano per lo più un odore di colla o di pasta inacidita.

Azione patogena.

Alle infezioni stafilococciche sono recettivi l'uomo, gli equini, i bovini, gli ovini.

Fra i piccoli animali d'esperimento si mostrano maggiormente recettivi il coniglio, la cavia, il topo.

La virulenza suole essere maggiore negli stipiti recentemente isolati, e va presto perduta nelle colture artificiali: si può tuttavia esaltare mediante successivi passaggi del germe per il corpo di animali d'una stessa specie, come anche inoculandolo insieme con colture uccise o filtrate di protei; pare che ciò possa anche ottenersi facendo sviluppare le colture in presenza di poco ossigeno. Gli effetti dell'infezione variano secondo il grado della virulenza e secondo la via d'inoculazione.

Iniettato nel coniglio sotto cute, lo stafilococco produce un ascesso, se è poco virulento; un edema gelatinoso, se è molto virulento. Nel primo caso l'animale può guarire; nel secondo caso invece muore di setticemia, con emorragie nel tessuto renale.

Iniettato nel peritoneo, anche in fortissima quantità, non produce effetti rilevanti.

Iniettato nelle vene, può dare setticemia, nefrite, ed in condizioni speciali d'esperimento anche endocardite.

Inoculato nelle articolazioni, può esser causa di artriti suppurative.

Veleni.

È provato che tanto i filtrati di brodocolture di qualche settimana, quanto gli estratti dei corpi batterici raccolti da agarcolture, hanno azione tossica per il coniglio e per la cavia: i primi sono stati riconosciuti più attivi dei secondi, ma anche i primi, per dare la morte dell'animale, devono essere inoculati in dosi piuttosto forti, di 2-5-10 cmc.

Il filtrato di brodoculture, iniettato nel peritoneo del cane, è capace di provocarne la morte per una peritonite siero-ematica, con ecchimosi nella sierosa e nella mucosa dell'intestino, con diarrea sanguinolenta; sotto cute o dà origine a un semplice essudato pastoso, o ad una flogosi suppurativa od emorragica o necrosante.

Da quanto è stato detto appare chiaro che lo stafilococco possiede un'endotossina.

Esso inoltre può produrre un'emolisina ed una leucocidina (van de Velde): Neisser e Wechsberg hanno osservato alcuni stipiti produttori di emolisina e non di leucocidina, e viceversa.

Questi due veleni speciali perdono ogni azione se il liquido che li contiene vien riscaldato per una mezz'ora a 55-60° C.

Da alcune esperienze risulta che lo stafilococco è anche dotato di potere aggressinico.

Azione antigena.

Dalle esperienze di Vignerat, Parascandolo, Petersen, Capman, Pröscher, Kolle ed Otto ed altri risulta complessivamente che si possono immunizzare degli animali, principalmente conigli, ma anche capre, inoculando loro ad intervalli opportuni colture uccise, poi attenuate, poi tal quali, di stipiti virulenti di stafilococchi; oppure inoculando filtrati tossici di brodocolture in dosi gradatamente crescenti. Il siero degli animali immunizzati è capace di proteggere, sia il coniglio, sia il topo, contro l'infezione eseguita con non più di 2 dosi minime letali di coltura virulenta, anche quando il siero viene inoculato 6-12 ore dopo avvenuta l'infezione. Poichè verso più di 2 dosi il siero non è efficace, bisogna convenire che il suo potere immunizzante è minimo.

Per tali sieri non è però mai riuscita la dimostrazione *in vitro* di un forte potere battericida.

Sono dimostrabili invece delle batteriotropine, talora in quantità rilevante.

Kolle ed Otto inoltre dimostrarono in un loro siero l'esistenza di agglutinine specifiche, attive anche in una diluzione di 1:1200.

L'emolisina e la leucocidina dello stafilococco provocano negli animali immunizzati con esse un' antiemolisina ed un' antileucocidina. L'antiemolisina è stata trovata anche nel siero di sangue di malati d'infezione

stafilococicca cronica. Questi due anticorpi non hanno alcun valore per ciò che riguarda lo stato d'immunità dell'organismo.

Applicazioni. — Esistono in commercio sieri antistafilococcici, che sono stati provati nell'uomo, in casi diversi d'infezione stafilococcica, ma con successo poco soddisfacente, in ogni modo contrastato.

Un'applicazione più recente e più fortunata è quella della vaccinazione introdotta da Wright. Nei malati d'infezione stafilococcica in genere l'indice opsonico è basso: tentasi di sollevarlo iniettando una sospensione di agarcoltura fresca di stafilococco, possibilmente dello stipite isolato dall'organismo infetto.

A tale scopo, isolato il germe, se ne prepara un'agarcoltura, che si lascia sviluppare per 24 ore a 37°; si sospende la patina in 10 cmc. di soluzione fisiologica, la sospensione si riscalda 20' a 60°, indi si fa la numerazione dei germi secondo il metodo descritto a p. 1281, e conforme al risultato che si ottiene, si diluisce in modo che 1 cmc. della diluzione contenga 500 milioni di germi. Alla diluzione preparata si aggiunge il 0.25 % di lisolo. In generale si fa una prima inoculazione sottocutanea di 100-200 milioni; quando l'indice opsonico, che dopo l'iniezione diventa ancora più basso di prima, sale ed oltrepassa nettamente il valore di 1, il che accade per lo più dopo 5-7 giorni, si fa una seconda inoculazione di 200-300 milioni; la terza inoculazione di 300-500 milioni si regola con le stesse norme. Occorrendo, altre iniezioni si possono fare fino ad inoculare in una volta sola un miliardo e più di germi.

Non è a credere però che questo metodo sia in tutti i casi coronato da buon successo. Riesce bene in casi di ostinate foruncolosi croniche o di seni fistolosi mantenuti da suppurazione; è per lo più infruttuoso in casi di stafilococcemia.

Isolamento.

Per isolare lo stafilococco si fanno delle colture a piatto in agar col metodo delle diluzioni, dopo aver convenientemente allungato il materiale da esaminare (pus, cenci necrotici, pezzi di organi, ecc.); si può anche, allorchè il materiale lo consente, fare un strisciamento a zig-zag, o più strisciamenti successivi paralleli, sulla superficie dell'agar precedentemente solidificato nelle scatole Petri.

Per fare l'isolamento dal sangue, se ne cavino 2-4 cmc. da una vena, previa disinfezione della cute, mediante una siringa sterilizzata, e si versino subito in altrettanto, o poco più, di una miscela anticoagulante di cloruro e citrato sodico ana 0.5 %. In laboratorio si allestiscono dalla miscela colture in brodo e colture a piatto su agar.

Le colture vanno messe in termostato a 37°, ed osservate ogni giorno, per almeno 3 giorni.

Si pescano le colonie sviluppate, e se ne fanno colture pure per procedere all'identificazione, giovandosi di tutti i caratteri descritti, eventualmente anche delle proprietà patogene.

Identificazione.

La diagnosi degli stafilococchi è spesso facile, quando si tiene conto di tutti i caratteri descritti, e specialmente delle proprietà microscopiche, dell'aspetto delle colonie e della fluidificazione della gelatina.

Lo stafilococco albo potrebbe esser confuso col *Micrococcus candicans* e con la *Sarcina alba*, lo stafilococco aureo col *Micrococcus aurantiacus* e con la *Sarcina aurantiaca*.

Il *Micrococcus candicans* si distingue dallo stafilococco albo principalmente perchè ha un diametro maggiore, di circa 1.2 μ, perchè non fluidifica la gelatina, non produce indolo nè idrogeno solforato, non coagula il latte.

Il *Micrococcus aurantiacus* si distingue dallo stafilococco aureo quasi unicamente perchè non fluidifica la gelatina.

La *Sarcina alba* e l'*aurantiaca* fluidificano la gelatina, ma si distinguono dagli stafilococchi albo ed aureo perchè dànno caratteristici pacchetti in tutti i terreni; la *aurantiaca* si distingue anche per il suo comportamento nel latte, che prima vien coagulato, poi rifluidificato.

Bisogna però avvertire che vi sono stipiti di stafilococchi i quali fluidificano pochissimo o quasi per niente la gelatina: in tal caso la diagnosi rispetto ai micrococchi non patogeni su nominati si può assicurare ricercando il potere emolitico e leucocida, l'azione patogena ed il comportamento verso un siero agglutinante specifico per gli stafilococchi.

Micrococcus ascoformans

o *Discomyces equi, M. botryogenes, Botryomyces, Botryococcus ascoformans.*

Fu trovato da Bollinger, nel 1870, nelle neoformazioni essenzialmente connettivali, a cordoni o a nodi, che si osservano specialmente nei cavalli, e che hanno sede nel funicello spermatico in seguito a castrazione, nel sottocutaneo, nel perimisio e nel tessuto pelvico retroperitoneale.

È stato anche riscontrato in casi di botriomicosi osservati nell'uomo.

Caratteri microscopici.

Tanto nel tessuto neoformato quanto nel pus cui esso dà luogo il germe si presenta in zooglee, grandi come granelli di sabbia e circondate da una capsula di aspetto gelatinoso.

Nei preparati fatti da coltura si vedono semplicemente cocchi delle dimensioni degli stafilococchi, per lo più aggruppati in coppie o in tetradi, resistenti al metodo del Gram.

Colture.

Si sviluppa in alcuni degli ordinari sostrati nutritivi, meno bene a 37° che a temperatura di stanza.

È aerobio, ma può svilupparsi anche in presenza di poco ossigeno.

Cresce malissimo, o per nulla, nell'agar.

Coltivato in siero di sangue può dare origine a granuli grossi come grani di miglio, che rappresentano delle zooglee.

Colonie in gelatina. — Le colonie superficiali ad occhio nudo sono piccole, rotonde, opache, grigiogiallastre; a piccolo ingrandimento mostrano un contorno rotondo e preciso, e presentano un colore giallobruno, senza altri caratteri peculiari. La gelatina è lentamente fluidificata.

La superficie delle piastre disseminate di colonie fa l'impressione, secondo Johne, come se fosse stata cosparsa di polline, e tramanda odore di frutta.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo, biancastro; retrazione a calice della superficie della gelatina, poi fluidificazione lenta, ad imbuto.

Strisciamento su patata. — Patina piuttosto spessa, di aspetto grasso, di colore giallastro, con odore di frutta.

Azione patogena.

Il *M. ascoformans* è patogeno non solo per il cavallo, ma in minor misura anche per i bovini, i suini, le pecore, le capre, le cavie, nei quali animali produce le su dette neoformazioni connettivali, con esito in suppurazione, che possono incontrarsi anche nella mammella, nel polmone, nelle ghiandole linfatiche, nelle ossa, nella mucosa nasale, nel padiglione dell'orecchio. Sperimentalmente si dimostra poco patogeno per i topi e per le cavie.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento si fa in siero di sangue e in gelatina. Per l'identificazione si tenga presente l'asserzione di Kitt, di Parascandolo, di Galli-Valerio, secondo i quali il *M. ascoformans* è una varietà di *M. pyogenes*; da questo si distingue, se mai, perchè si coltiva male in agar e perchè dà zooglee sul siero di sangue.

Micrococcus tetragenus.

Fu trovato da Koch e Gaffky nel 1883.

Si riscontra nelle caverne polmonari e nello sputo dei tisici; si può incontrare anche in ascessi e nella cavità orale di persone sane.

Caratteri microscopici.

Il *M. tetragenus* ha dimensioni variabili, che però spesso coincidono con quelle di uno stafilococco. Nell'organismo si presenta sempre aggruppato in tetradi, circondate da una capsula abbastanza spessa; nelle colture,

oltre alle tetradi, che rappresentano l'ordinamento più frequente, si mostra anche in coppie e talora in piccoli accumuli irregolari.

Colture.

Cresce bene in aerobiosi, ma anche con una tensione d'ossigeno inferiore a quella che questo gas ha nell'atmosfera. L'ottimo di temperatura è 37°; lo sviluppo avviene anche rigoglioso a temperatura di stanza. Tutti i comuni sostrati di coltura sono adatti alla moltiplicazione del *Micrococcus tetragenus*.

Colonie in agar. — Ad occhio nudo le colonie superficiali sono piccole, irregolari, con margini lisci, biancastre, lievemente rilevate, con lucentezza grassa. A piccolo ingrandimento mostrano un contorno sinuoso, con accenno di sfrangiature, un colore grigio scuro nella parte centrale, che è opaca, e grigio chiaro alla periferia, che è trasparente.

Le colonie profonde sono più piccole, irregolari, opache, grigioscure, granulose.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar, salvo che sono meno rigogliose.

Coltura in brodo. — Il brodo è limpido o quasi; al fondo vi è un sedimento fioccoso piuttosto abbondante.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, liscia, biancastra, quasi opaca, con lucentezza grassa.

Acqua di condensazione coi caratteri della brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Lungo la linea d'infissione si nota nel tratto alto un nastrino continuo, grigiastro, granuloso; nel tratto inferiore una filza di piccole colonie. Alla superficie si vede una colonia larga 2-3 mm., rilevata nel centro, con margini lobati e con gli altri caratteri simili a quelli delle colonie in gelatina a piatto.

Non vi è fluidificazione.

Coltura in latte. — Per lo più il latte viene coagulato dopo 4-5 giorni; talvolta la coagulazione manca.

Strisciamento su patata. — Patina simile a quella che cresce sull'agar, non di rado mucosa e filante.

Attività biochimiche.

Nei terreni zuccherati produce una piccola quantità di acidi. Nelle colture in agar tramanda un odore di colla.

Non produce indolo nè idrogeno solforato.

Azione patogena.

Il *Micrococcus tetragenus* è specialmente patogeno per i topi e ratti bianchi e per le cavie; in minor grado per i conigli. I topi e ratti grigi sono quasi refrattari.

Inoculato negli animali recettivi produce una setticemia con decorso rapidissimo; nel coniglio produce soltanto affezioni locali, come ascessi, peritonite, ecc.

Isolamento e identificazione.

Per isolare questo germe, si ricorra alle piastre in agar.

Potrebbe confondersi con alcune sarcine; la distinzione si fa mediante la coltura in decotto di fieno, nel quale il *M. tetragenus* non dà mai pacchetti, laddove tutte le sarcine presentano tale aggruppamento.

Micrococco della mastite gangrenosa delle pecore.

Fu trovato da Nocard nel 1887, ed è causa di una forma di mastite che colpisce le pecore ed ha un decorso così rapido da produrre la morte in 24-48 ore.

Il germe si riscontra soltanto nel latte e nel liquido edematoso delle mammelle, talora anche nel liquido sieroso endoperitoneale degli animali malati.

Caratteri microscopici.

È un cocco piccolissimo, il cui diametro è anche alquanto inferiore a $^1/_3\ \mu$: così nell'organismo malato come nelle colture presentasi in coppie, in tetradi o in irregolari gruppetti. Si tinge bene con tutti i colori d'anilina, e resiste al Gram.

Colture.

È aerobio, con facoltà di anaerobiosi. Cresce bene a 37° e a temperatura di stanza, negli ordinari terreni di coltura, i quali sono ancor più favorevoli se contengono degli zuccheri.

Colonie in gelatina. — Le colonie superficiali sono abbastanza grandi, rotondeggianti, biancastre, semitrasparenti; esse fluidificano ben presto la gelatina. A piccolo ingrandimento appaiono di colore brunastro e di aspetto omogeneo.

Le colonie profonde sono più piccole, e non fluidificano la gelatina che molto lentamente.

Coltura in brodo. — Brodo torbido, con abbondante sedimento biancastro polverulento: già dopo il primo giorno il sostrato, se era alcalino o neutro, diventa acido. Più rigoglioso è lo sviluppo in brodo zuccherato.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, spessa, in principio biancastra, poi leggermente giallastra. L'acqua di condensazione è torbida come la brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Si forma lungo l'infissione un nastrino continuo, biancastro; la parte superiore della gelatina comincia a fluidificarsi fin dal secondo giorno, in forma d'imbuto: la gelatina liquefatta è torbida per il gran numero di germi che vi sono sospesi.

Coltura in latte. — Il germe si sviluppa rapidamente, coagulandolo in 24 ore, sotto forma di un cilindro compatto.

Strisciamento su patata. — Patina piuttosto sottile, grigiastra, viscosa, con margini festonati e rilevati, di colore bianco sporco, più tardi giallastro.

Attività biochimiche.

Produce notevole quantità di acidi scindendo gli zuccheri.

Azione patogena.

L'unico animale che si mostra recettivo all'infezione sperimentale con le colture è la pecora, che è pure l'unico animale capace di ammalarne spontaneamente. Inoculando una coltura virulenta nel condotto galattoforo di una pecora sana si ottiene la riproduzione della malattia, coi sintomi e le alterazioni caratteristiche della malattia spontanea: mammelle molto cresciute di volume, impregnate di liquido edematoso roseo, che infiltra anche il sottocutaneo del perineo, della faccia interna delle cosce, della regione inferiore del tronco; leggiero versamento sieroso o siero-ematico nel peritoneo; milza piccola e friabile; intensa congestione dei vasi sanguigni del mesentere e dell'intestino.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento si fa in qualsiasi dei terreni comuni, seminandovi il latte o il liquido edematoso che infiltra le mammelle.

Il germe appartiene senza dubbio al genere *Micrococcus*; per l'identificazione basta riconoscere la piccolezza degli individui, che non si riscontra in nessun'altra specie, eccetto il *M. melitensis*, il quale però distinguesi per altri caratteri, sopra tutto perchè non resiste al metodo del Gram, non fluidifica la gelatina e non coagula il latte.

Micrococco dell'osteomalacia

o *Diplococco dell'osteomalacia umana.*

Arcangeli e Fiocca nel 1901, e poi negli anni successivi, isolarono uno speciale diplococco da frammenti di ossa malate (costole, ossa iliache) in casi di osteomalacia umana; tale reperto fu ottenuto anche da altri autori. Arcangeli una volta e Signorelli un'altra volta isolarono il diplococco anche dall'urina.

Il germe isolato somiglia molto ne' suoi caratteri a quello che il Morpurgo aveva l'anno avanti riconosciuto causa di una forma infettiva di osteomalacia osservata nei topi albini, a quello che Artom, alcuni anni dopo, ha isolato in casi di rachitide umana, e Bignami in un caso di morbo di Paget. Diplococchi simili sono stati isolati anche in casi di osteomalacia del porco e del cavallo.

Caratteri microscopici.

Cocchi rotondi del diametro di 0.6-0.8 μ, aventi le proprietà generali del genere *Micrococcus*, inteso nel senso di Lehmann e Neumann, come è stato detto a pag. 1435. Trovasi principalmente aggruppato in coppie, ma anche in tetradi ed in brevissime catenelle di 4-6 articoli; più di rado in piccoli gruppetti irregolari. Si colora bene, anche col metodo del Gram.

Colture artificiali.

È aerobio, con facoltà di anaerobiosi. Cresce nei comuni terreni di coltura, tanto a 37°, quanto a temperatura di stanza.

Colonie in agar. — Sono ad occhio nudo rotonde, bianche, opache, leggermente rilevate; a piccolo ingrandimento dimostrano contorno liscio, colore giallo bruno nel centro, chiaro alla periferia.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar; v'è di più che, dopo 8-10 o più giorni, appaiono circondate di un sottile alone di fluidificazione.

Coltura in brodo. — Il brodo fra il 2° e il 3° giorno è uniformemente torbido, ma poi presto si fa chiaro, mentre la massa batterica si depone al fondo in forma di fiocchetti.

La reazione alcalina del brodo non è alterata neppure dopo parecchi giorni.

Strisciamento su agar. — Patina uniforme, biancastra, spessa, opaca, liscia, con lucentezza grassa.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo; leggiera fluidificazione del sostrato, cominciante verso il principio della seconda settimana e procedente con molta lentezza.

Azione patogena.

Il Morpurgo, inoculando colture pure del suo diplococco isolato dai topi albini, riprodusse in ratti sani adulti la stessa forma della osteomalacia spontanea, nei neonati una forma analoga alla rachitide.

Il diplococco isolato dall'uomo non si dimostra patogeno per le cavie e per i conigli; in qualche caso è stato riconosciuto patogeno per i topi albini (Morpurgo), nei quali si producono a poco a poco alterazioni scheletriche simili a quelle che s'incontrano negli stessi animali affetti da forme lievi di osteomalacia o rachitide.

Col diplococco isolato dall'osso in casi di rachitide umana l'Artom riprodusse profonde alterazioni scheletriche nei ratti albini.

Coi diplococchi isolati da maiali e da cavalli osteomalacici fu sperimentalmente riprodotta la malattia rispettivamente in maiali e cavalli sani. Alla infezione col diplococco isolato dai maiali sono recettivi anche i conigli, che ammalano d'osteomalacia.

Circa l'azione del germe sull'osso, Arcangeli e Fiocca pensarono ad un'alterazione funzionale degli osteoblasti, ed Arcangeli poi fece l'ipotesi della presenza di un fermento speciale nell'osso osteomalacico, fermento osteolitico che fu dimostrato da Morpurgo e Satta.

Azione antigena.

Nel siero di sangue di alcune malate di osteomalacia, diluito in rapporti di 1:10-1:30, Arcangeli e Fiocca, Stefanelli e Levi notarono un'azione agglutinante, visibile anche ad occhio nudo.

Le colture del diplococco dell'osteomalacia, trasformate in vaccini col metodo di Wright, ed inoculate nelle persone inferme, producono la formazione di opsonine nel sangue, ed un miglioramento abbastanza rapido e netto, da far pensare talvolta ad una quasi effettiva guarigione (Arcangeli, Artom).

Isolamento e identificazione.

L'isolamento del diplococco si fa da una costola o dalla cresta iliaca, incidendo la pelle e il periostio ed asportando con una sgorbia piccoli frammenti d'osso, che si pongono a sviluppare in brodo o su agar a 30-35° C.

Manifestatosi lo sviluppo, se ne fanno i trapianti.

Essendo ancora pochi i caratteri studiati, bisogna per l'identificazione accontentarsi di notare sopra tutto l'aggruppamento dei cocchi, e la lentezza e scarsezza della fluidificazione della gelatina, e di ricercare la sua eventuale azione patogena.

Il germe, come abbiamo detto, è un *Micrococcus*; se costituisca una specie a sè o una varietà di altra specie già ben definita, non si può ancora affermare.

Micrococcus catarrhalis.

Fu isolato da Seifert nel 1884, e poi meglio studiato da R. Pfeiffer. S'incontra nelle secrezioni delle vie respiratorie, in casi di bronchiti e polmoniti; spesso anche in persone sane.

Caratteri microscopici.

Cocchi del diametro di circa 1 μ, riuniti in coppie, ed anche in tetradi, mai in catenelle, quasi mai in piccoli gruppetti irregolari. Non si colora col metodo del Gram.

Colture artificiali.

È aerobio; cresce bene nei comuni sostrati, così a 37°, come a temperatura di stanza.

Colonie in agar. — Le colonie superficiali sono ad occhio nudo rotondeggianti, grigio-biancastre, del diametro massimo di 1-2 mm., quasi opache; a piccolo ingrandimento mostrano un contorno irregolare, come smangiato. Nel complesso le colonie sono più delicate di quelle dello stafilococco albo, ma assai meno di quelle dello streptococco.

Su agar con siero o su agar zuccherato le colonie sono più rigogliose.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar, ma sono ancora più delicate: la gelatina non è mai liquefatta.

Coltura in brodo. — Brodo uniformemente torbido, con poco sedimento biancastro fioccoso al fondo, e spesso con una sottile pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina somigliante a quella dello stafilococco albo, però più sottile e d'un bianco più tendente al grigiastro.

Infissione in gelatina. — Nastrino sottilissimo, continuo nel tratto superiore, composto di una filza di piccole colonie nell'inferiore. Fluidificazione mancante.

Coltura in latte. — Il germe cresce nel latte, senza coagularlo.

Strisciamento su patàtà. — Patina sottilissima, grigia, splendente.

Attività biochimiche.

Non produce indolo, nè idrogeno solforato. In presenza di qualsiasi zucchero non dà mai gas.

Azione patogena.

Il *M. catarrhalis* ha debole azione patogena per i conigli, per le cavie, per i topi bianchi. Soltanto grandi quantità di coltura, inoculate nel peritoneo, producono la morte degli animali.

Questo germe fu isolato la prima volta in coltura pura in un caso di bronchite purulenta. Lo scrivente ebbe occasione di ottenerlo in coltura pura dal secreto bronchiale di due persone affette da grave bronchite, clinicamente diagnosticata di natura influenzale. In tal caso, è bene aggiungere, la ricerca batteriologica era stata fatta allo scopo di svelare il B. dell'influenza, che però non fu dimostrabile al microscopio e neanche con le colture.

Si può ammettere che il *M. catarrhalis* sia in alcuni casi veramente causa di affezioni delle vie respiratorie nell'uomo.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento è facile nei comuni terreni.

La diagnosi differenziale rispetto allo stafilococco albo si fa per l'aggruppamento, perchè non resiste al Gram e non fluidifica la gelatina; rispetto allo streptococco perchè non resiste al Gram e non dà mai catene.

Per la diagnosi rispetto al gonococco ed al meningococco, coi quali più facilmente può confondersi, vedi il capitolo sul meningococco.

Micrococcus gonorrhoeae

o *Gonococco, Diplococco della blenorragia.*

Fu scoperto da Neisser nel 1879 e perfettamente isolato in coltura pura da Bumm nel 1885.

È causa della blenorragia uretrale e di altre affezioni dell'apparato urogenitale maschile e femminile, della congiuntivite blenorragica dei neonati, di artriti, endocarditi, meningiti; può anche produrre setticemia.

Caratteri microscopici.

I gonococchi si presentano quasi costantemente uniti a coppie, e i due individui, avendo aspetto uniforme, sono accostati per il lato leggermente concavo o piano: sicchè ogni coppia rende l'immagine di un chicco di caffè. Ogni coppia è lunga 0.8-1.6 μ, larga 0.6-0.8 μ. Spesso trovansi unite molte coppie, fino a 10-20 e più, aggruppate irregolarmente, e contenute nel protoplasma dei leucociti o delle cellule epiteliali (v. fig. 508); non mancano quasi mai gli elementi extracellulari, anzi in casi di blenorragia cronica possono essere molto più numerosi degli intracellulari.

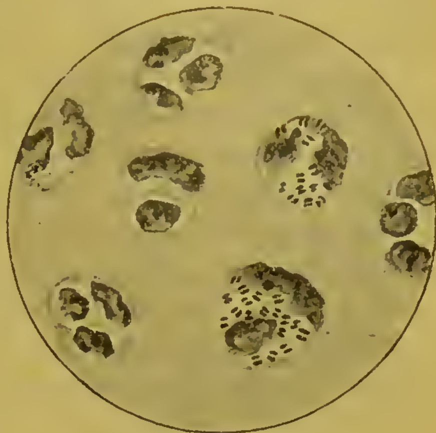


Fig. 508. — Gonococco.

Si colorano rapidamente, anche a freddo, con tutti i colori basici d'anilina, non però col metodo del Gram.

Colture.

Si coltiva difficilmente. Per le colture d'isolamento è necessario che il sostrato contenga sostanze proteiche non denaturate, ed abbia una reazione alcalina rispetto al tornasole e leggermente acida rispetto alla fenolftaleina: la prima condizione è stata messa in luce principalmente da Wertheim, e poi confermata da molti autori; la seconda è stata segnalata da Thalmann. Una volta isolato, il gonococco può anche crescere in alcuni terreni comuni, ma in modo stentato e meschino, e solo per poche generazioni quando il trapianto dai terreni speciali nei comuni sia stato fatto fin dalle primissime generazioni. Non cresce però mai in gelatina e su patata.

L'ottima temperatura di sviluppo è 37°; la minima, secondo le più recenti indagini di Neisser, 29°; la massima 39°.

È aerobio, con facoltà di anaerobiosi.

Per la preparazione dei sostrati nutritivi adatti, v. p. 1253-1254.

Colonie su agar con siero o con liquido ascitico o con altro liquido equivalente. — Sono rotondeggianti, sottili, trasparenti, piane, grige, di aspetto quasi mucoso.

A piccolo ingrandimento dimostrano un contorno mal distinto, un colore grigio pendente al gialliccio, ed appaiono finamente granulose o del tutto omogenee. Il contorno delle colonie invecchiate diventa ondulato o lobato, l'interno molto granuloso, talora moriforme. Quando si semina direttamente il pus gonococcico, siccome questo si contrae lasciando dei

tratti liberi, le colonie crescono appunto in questi setti, confluendo in parte fra loro.

Coltura in brodo con siero umano o liquido ascitico (parti 3 + parte 1) *oppure in brodo con siero di maiale nutrosato al 2 % a parti uguali* (v. p. 1254). — Il liquido nutritivo talvolta s'intorbida uniformemente, altre volte resta limpido o quasi, mentre si forma uno scarso sedimento biancastro fioccoso al fondo, ed in superficie una pellicola discontinua, composta come di finissime briciole.

Strisciamento su agar con siero ecc., come sopra. — Patina continua, sottile, grigia, trasparente, di aspetto quasi mucoso, con margini leggermente rilevati.

Vitalità in coltura. — Il gonococco ha una vitalità che si conserva nelle colture per tempo relativamente breve. Dopo 2-4 giorni, in casi eccezionali soltanto dopo 8 giorni, il gonococco perde la sua vitalità; perciò bisogna fare frequenti trapianti entro questi termini di tempo. La vitalità è maggiore se i trapianti si fanno in terreni speciali; se si fanno in terreni ordinari, essa è breve nel caso che il materiale di semina si prelevi dalle prime generazioni cresciute nei terreni speciali, è invece abbastanza lunga quando si seminano gonococchi già prima trapiantati molte volte nei terreni speciali.

Attività biochimiche.

È stato studiato il comportamento del gonococco rispetto a diverse specie di zuccheri aggiunti ai sostrati nutritivi, ed è stato visto che, mentre attacca il glicosio con produzione di acidi, lascia intatti il lattosio, il saccarosio, il maltosio, il fruttosio, il galattosio. Non produce mai gas.

Azione patogena.

Son note le esperienze di trasmissione all'uomo, nel quale, mediante l'inoculazione di colture pure, si son potute riprodurre l'uretrite e la congiuntivite blenorragica.

Non si è riusciti però ad infettare col gonococco alcuno degli animali di laboratorio. Solo il Carbone, inoculandolo nella cavità pleurica di giovani conigli, ottenne una pleurite purulenta con essudato ricco di forme caratteristiche.

Iniettando forti dosi di coltura, si ottengono soltanto delle flogosi, però senza moltiplicazione dei germi: si tratta dunque di un'azione tossica.

Veleni.

Schäffer, filtrando attraverso candele di porcellana colture di gonococco in brodo ascitico, ottenne un liquido con azione piogena sulla mucosa uretrale.

Wassermann, avendo ottenuto colture rigogliose in brodo con siero di maiale e nutrosio, constatò che, uccise, hanno potere tossico, dimostrabile mediante inoculazioni nei topi e nei conigli. Inoculate sotto cute producono infiltrazioni pastose con esito frequente in necrosi; in dosi maggiori dànno fenomeni tossici generali e la morte.

Sostanze tossiche possono anche ottenersi dalle colture del gonococco in terreni solidi, con vari procedimenti autolitici.

Esempio di un metodo autolitico è quello del Vannod. Si seminano ampie superficie di terreni nutritivi solidi speciali; si fanno sviluppare le colture per due giorni a 37°, indi le patine vengono sospese in acqua distillata; la sospensione vien sottoposta allo scotimento per due giorni, poi centrifugata; il liquido limpido separato dal sedimento contiene l'endotossina.

Lo stesso Vannod estrasse dalle colture di gonococco il nucleoproteide, secondo il metodo di Lustig e Galeotti (v. p. 1302): inoculato nelle vene dei conigli, nella dose di 0.05-0.06 gr., ne produce la morte rapidamente, nello spazio di 3-5 minuti.

Azione antigena.

Si può immunizzare il coniglio, ed anche il cavallo, verso il gonococco, inoculando per vie diverse le colture o i prodotti tossici.

Da studi comparativi d'immunizzazione fatti da Vannod nel coniglio si desume che il nucleoproteide estratto secondo il metodo di Lustig e Galeotti si presta meglio di altri preparati. Nel siero degli animali immunizzati con tale procedimento si possono dimostrare delle agglutinine attive per lo più fino alle diluzioni 1:400-1:500: la loro specificità non è però assoluta, poichè il siero dà una reazione di gruppo per il meningococco, anche quando è diluito nel rapporto 1 : 200-1: 300. Siffatte reazioni di gruppo non sono state osservate invece nè per lo stafilococco nè per lo streptococco.

Il siero antigonococcico contiene anticorpi fissatori del complemento, dimostrabili in presenza di prodotti d'autolisi delle colture di gonococco. Tali anticorpi sono specifici, e non dànno reazioni di gruppo neppure col meningococco.

Diagnosi batterioscopica del gonococco.

Praticamente la semplice dimostrazione microscopica del gonococco ha valore diagnostico solo in casi di blenorragia dell'uomo e di congiuntivite blenorragica: nei casi di affezioni dei genitali muliebri, come anche di eventuali localizzazioni fuori dell'apparato genitale in ambo i sessi, non si può asserire una diagnosi certa altro che dopo aver fatto l'isolamento e l'identificazione.

Per la dimostrazione microscopica del gonococco nel pus si possono adoperare il liquido di Ziehl diluito 1:10, la soluzione fenicata di tionina, la soluzione idroalcoolica di turchino di metilene.

Eleganti preparati si hanno col metodo di Schütz, che si eseguisce così. Si colora prima con soluzione satura di turchino di metilene in acqua carbolica al 2 %, a freddo per 5', e poi, dopo rapido lavaggio in acqua o in soluzione di acido acetico 1 %, si ricolora per 45", sempre a freddo, con soluzione acquosa di safranina 1:1500. I gonococchi restano colorati in un bel turchino carico, il protoplasma degli elementi cellulari in rosa, i nuclei in una tinta fra il rosso e il marrone, simile alla lacca giapponese.

Per accrescere sicurezza alla diagnosi, bisogna sempre eseguire anche il metodo del Gram, modificandolo nei seguenti punti: la prima colorazione si fa con soluzione di cristalvioletto fenicata (v. p. 1231), la decolorazione con alcool assoluto, la seconda colorazione con soluzione acquosa di fucsina 1:2000, a freddo, per 10-15".

Isolamento e identificazione.

Per isolare il gonococco bisogna por mente alla qualità ed alla reazione del terreno nutritivo, ed alla necessità di seminare il materiale di coltura il più presto possibile.

I sostrati nutritivi da adoperare sono:

l'agar ascitico di Kiefer e di Wertheim (liquido ascitico p. 1 + agar al 2 %, leggermente alcalinizzato, p. 1);

il terreno di Lipschütz (100 cmc. di soluzione acquosa di ovoalbumina secca al 2 % + 20 cmc. di soluzione $N/_{10}$ di $NaOH$ + 230 o 360 cmc. di agar ordinario neutro);

il terreno di Wassermann, modificato da Vannod (15 cmc. di siero di maiale + 50 cmc. d'acqua distillata + 3 cmc. di glicerina + 1 gr. di nutrosio + 70 cmc. di agar al 2 %).

I terreni devono avere una reazione leggermente alcalina rispetto al tornasole; secondo Thalmann dev'essere ottenuta aggiungendo ad essi i $^3/_4$ della quantità totale di soluzione sodica necessaria per neutralizzarli rispetto alla fenolftaleina.

Dalle riprove fatte risulta però che tal grado di alcalinità è ancora un po' forte; onde è meglio aggiungere della soluzione di carbonato sodico al 10 % cautamente, fino ad ottenere una reazione appena alcalina, saggiata col tornasole. Rispettando questa condizione dell'alcalinità, il gonococco può anche essere in alcuni casi isolato ed ulteriormente coltivato in agar semplice, senza che a questo sia necessario aggiungere altre sostanze.

Ma occorre ancora, per riuscire allo scopo, che l'allestimento delle colture sia fatto subito dopo il prelevamento del materiale, e che i ter-

reni seminati vengano subito posti alla temperatura ottima di sviluppo. Ciò risulta evidente da alcune indagini comparative del Vannod.

Egli seminava delle piastre con pus gonorroico; prima di essere poste a sviluppare nel termostato a 37°, alcune di esse erano tenute per $^1/_4$ - $^1/_2$ - 1 - 2 ore a 22°, altre per gli stessi tempi a 19°, altre a 12°.

Osservando le piastre dopo 48 ore, riconobbe rigoglioso sviluppo in quelle che erano state tenute a temperatura meno bassa e per una durata più breve.

I risultati precisi si desumono dalla seguente tabella, in cui +++ significa sviluppo rigogliosissimo, ++ rigoglioso, + mediocre, ± meschino, — nullo.

Dopo h di permanenza	a 22°	a 19°	a 12°
dopo ¼ h	+++	++	±
» ½ h	++	+	—
» 1 h	++	±	—
» 2 h	+	—	—

Per l'identificazione del gonococco, conviene tener presente sopra tutto il suo comportamento rispetto al metodo del Gram e la difficoltà di ottenerlo in colture artificiali. Vi sono dei cocchi morfologicamente non differenziabili dal gonococco, anche perchè, come questo, non resistono al Gram: tali sono il *Micrococcus catarrhalis*, il *M. albicans amplus* e il *Diplococcus albicans tardissimus*, che però si distinguono perchè tutti e tre si coltivano, benchè stentatamente, in gelatina.

Per differenziare il gonococco dal meningococco vi sono dei criteri che saranno ricordati a proposito del meningococco.

Micrococcus meningitidis

o *Meningococco, Diplococcus intracellularis meningitidis.*

Marchiafava e Celli lo descrissero fin dal 1884 nel liquido cerebrospinale di due persone morte di meningite; Weichselbaum nel 1887 lo isolò e studiò in colture pure; Jäger nel 1895 dimostrò in grande il nesso etiologico fra il germe e la meningite cerebrospinale epidemica.

Si trova nel liquido cerebrospinale dei malati di questa infezione, come anche eventualmente nel sangue, nell'urina, nel muco nasale, nello sputo. Secondo alcuni può trovarsi anche nel muco nasale d'individui non malati di meningite (portatori di meningococco).

Caratteri microscopici.

Il meningococco somiglia moltissimo al gonococco; anch'esso è appaiato, e le sue coppie rendono l'immagine di chicchi di caffè; più frequentemente del gonococco mostrasi anche aggruppato in tetradi, talora anche in cortissime file di 4-6 elementi. Anch'esso può trovarsi nell'interno dei leucociti e delle cellule endoteliali. Solo si nota che insieme con gli individui di grandezza normale se ne trovano alcuni molto più grossi ed altri molto più piccoli: questo fatto non accade che raramente, ed in minor misura, nel gonococco.

Si colora facilmente coi colori basici d'anilina; non resta però mai colorato col metodo del Gram.

Nelle colture artificiali il meningococco diventa semplicemente rotondo od ellittico, pur sempre dimostrando l'aggruppamento in coppie, tetradi e cortissime catenelle.

Colture.

L'ottimo di temperatura è 37°, il minimo 24°, il massimo 42°. È aerobio, ma può anche crescere in anaerobiosi.

Cresce in alcuni degli ordinari terreni di coltura, quali sono l'agar e il brodo, ma scarsamente; dà invece colture abbondanti nei sostrati contenenti siero di sangue o liquidi equivalenti.

Nelle colture di isolamento bisogna sempre avvalersi di questi terreni speciali.

L'aggiunta di glicosio favorisce lo sviluppo, non quello di glicerina.

Pare che qualche stipite possa crescere, benchè assai meschinamente, sulla patata e sulla gelatina molto densa, che però non è mai fluidificata.

Colonie in agar ascitico o agar con siero. — Sono rotonde, piccole, sottili, trasparenti, lievemente rilevate, di aspetto viscoso. A piccolo ingrandimento somigliano, come del resto anche ad occhio nudo, a quelle del gonococco.

Coltura in brodo con siero. — Leggiero intorbidamento, con scarso sedimento biancastro fioccoso al fondo, e talora pellicola discontinua in superficie.

Strisciamento su agar con siero. — Patina continua, uniforme, abbastanza spessa, di colore bianco sporco.

Coltura in latte. — Alcuni stipiti di meningococco si sviluppano nel latte, senza però mai coagularlo.

Vitalità in coltura. — Il meningococco ha corta vitalità nei terreni di coltura, spesso di 1-2 giorni soltanto, quando l'isolamento fattone è recente; più lunga la dimostra dopo che per un certo numero di trapianti è stato assuefatto ai terreni artificiali.

Attività biochimiche.

Il meningococco attacca il maltosio e il destrosio con formazione di acidi, non di gas; non tocca per nulla il saccarosio, il lattosio, il galattosio, il fruttosio, la dulcite, la mannite, l'inulina.

Azione patogena.

Il meningococco è in generale poco patogeno per gli animali di esperimento: la sua virulenza è variabilissima.

Possono esserne infettate le giovani cavie, le quali soccombono specialmente se la coltura, in quantità rilevante, viene inoculata nella cavità pleurica o peritoneale. Anche i giovani conigli e i topi si mostrano recettivi all'infezione, purchè s'inoculino quantità forti di coltura.

Alcuni autori asseriscono di aver riprodotta una vera e propria meningite cerebrospinale nella scimmia e nella capra, ricorrendo alla iniezione sottodurale.

Veleni.

I filtrati delle colture liquide non hanno alcuna azione tossica.

I corpi batterici uccisi hanno proprietà tossiche, le quali si riscontrano anche nei loro prodotti di autolisi in presenza di toluolo, o nei loro estratti ottenuti con acqua distillata o con soluzione $N/_{20}$ di carbonato sodico.

Si può dire dunque che il meningococco dà un'endotossina, la quale però appare debole, se si pensa che ne occorrono parecchi cmc. per ottenere la morte degli animali d'esperimento.

Azione antigena.

Si possono immunizzare verso il meningococco cavalli, pecore, capre, inoculando loro colture o autolizzati.

Mescolando insieme i sieri di più animali appartenenti a queste tre specie, immunizzati con colture di molti stipiti recentemente isolati dal liquido cerebrospinale, si ottiene un siero polivalente e multiparziale (Jochmann).

Il siero di Ruppel è ottenuto dal solo cavallo, immunizzato però con più stipiti. Il siero di Wassermann e di Kolle proviene pure dal solo cavallo, immunizzato però con autolizzati di colture ottenute da parecchi stipiti virulenti. Analoga è la preparazione dei sieri di Flexner e di Dopter. Tutti questi sieri sono multiparziali.

Nei sieri antimeningococcici si possono dimostrare in generale delle agglutinine, attive in diluzioni di 1:1000 - 1:2000: si notano però forti reazioni di gruppo per il gonococco.

Secondo Wassermann, i sieri hanno anche un forte potere batteriotropo, ma non è stato possibile farne determinazioni quantitative.

Sono stati dimostrati altresì anticorpi fissatori del complemento, attivi in presenza di autolizzati, e di natura veramente specifica.

Per alcuni sieri non si può escludere un'azione antitossica (Kraus), pensando che quello di Ruppel, per esempio, nella quantità di 0.01 cmc., protegge i topi contro l'azione di ben 100 dosi minime letali di coltura.

I sieri antimeningococcici sono entrati nella pratica, e secondo i dati statistici ottenuti in America col siero Flexner, in Francia con quello Dopter, in Germania con quelli di Wassermann, di Kolle e di altri, essi dimostransi curativamente efficaci quando sono iniettati in quantità notevole, nello speco vertebrale, in casi di meningite da meningococco, purchè non siano casi molto avanzati.

Diagnosi batterioscopica.

Ha valore pratico allorchè in un luogo si sono già verificati altri casi di meningite cerebrospinale certa. Si centrifuga il tiquido cerebrospinale estratto con la puntura lombare, e del sedimento si fanno preparati colorati semplici e col metodo del Gram. Riscontrando i caratteri microscopici descritti, si può formulare una diagnosi batteriologicamente probabile, clinicamente sicura.

Isolamento e identificazione.

Per isolare il meningococco dal liquido cerebrospinale, questo si centrifuga, ed il sedimento si semina su agar ascitico oppure su siero di Löffler; le colture si mettono subito a sviluppare a 37°. In genere nascono pochissime colonie, dalle quali si possono ottenere colture via via più rigogliose facendo frequenti passaggi in terreni speciali. Il meningococco, una volta assuefatto a questi, può essere ulteriormente coltivato anche in sostrati comuni glicosati. Talora in questi riesce la coltura anche se si semina direttamente il materiale proveniente dall'organismo.

Si consiglia in ogni caso di mettere da parte un po' di liquido cerebrospinale, e tenerlo 24 ore a 37°, per ripetere eventualmente le colture il giorno dopo.

È ancora da avvertire che, come per il gonococco, così anche per il meningococco, bisogna allestire le colture e metterle a 37° nel più breve tempo possibile dopo la raccolta del materiale.

Similmente si procede per isolare il meningococco da altro materiale, come per esempio dal muco nasale: solo in questo caso le difficoltà crescono per la presenza di altri cocchi morfologicamente simili. Per il prelevamento del materiale dalla parte profonda delle fosse nasali, si faccia uso di piccoli batuffoli montati su fili metallici (v. p. 1259), quali furono consigliati da Westenhoffer.

Per la diagnosi differenziale del meningococco si tenga presente anzi tutto la sua non resistenza al Gram: per esempio il *Diplococcus crassus*, che corrisponde al così detto meningococco di Jäeger, se ne distingue già subito perchè è resistente al Gram. Il *Micrococcus catharralis*, invece, ed il *Diplococcus flavus* non resistono, quindi si possono microscopicamente confondere col meningococco. Tuttavia questi cocchi hanno comune l'isolamento e la coltivazione più o meno facili nei comuni terreni di coltura. Assai più difficile riesce invece la diagnosi batteriologica fra meningococco e gonococco.

Soccorrono alla diagnosi i dati concernenti l'azione che i diversi cocchi hanno su varie specie di zuccheri.

Produzione d'acidi dal	Glicosio	Maltosio	Fruttosio	Galattosio	Lattosio	Saccarosio
Meningococco	+	+	—	—	—	—
Diplococcus flavus . . .	+	+	+	—	—	—
» *crassus* . .	+	+	+	+	+	+
Micrococcus catarrhalis. .	—	—	—	—	—	—
Gonococco.	+	—	—	—	—	—

Parrebbe che il meningococco ed il gonococco, comportandosi diversamente rispetto al maltosio, potrebbero essere diagnosticati senz'altro con le colture in terreni maltosati. Ma tale differenza non è costante, onde la necessità di ricorrere ad altri criteri per distinguere il meningococco dal gonococco.

Tali criteri scaturiscono da quanto è stato detto sulle proprietà antigene di questi due cocchi.

I sieri antigonococcico ed antimeningococcico contengono delle agglutinine, le quali però hanno azione, oltre che sul germe omologo, anche sull'altro: onde il potere agglutinante di tali sieri non può fornire dati sicuri per la diagnosi. Ma abbiamo visto che gli stessi sieri contengono anche anticorpi fissatori del complemento, e che questi sono specifici solo per il germe omologo.

Si può dunque eseguire la prova di Bordet e Gengou con un siero antimeningococcico e con un siero antigonococcico, adoperando come antigeni non le colture del germe da diagnosticare, ma gli autolizzati ottenuti da esse col metodo descritto nel capitolo del gonococco. Si dirà che il germe in esame è meningococco allorchè la deviazione del complemento sarà avvenuta col siero antimeningococcico, non con l'antigonococcico: analogo valore ha la proposizione inversa.

Micrococcus melitensis.

Fu scoperto dal Bruce nel 1887. È causa della febbre mediterranea, detta anche di Malta, che nel passato era confusa con la febbre tifoide o con alcune forme di febbre malarica.

Si trova nel sangue e negli organi, principalmente nella milza, dei malati; talvolta passa nell'urina. Pieri l'ha isolato in coltura pura dal pus di un focolaio osteomielitico verificatosi in una persona affetta da febbre mediterranea.

Può trovarsi altresì nel sangue e passare nel latte delle capre infette, che in genere non presentano segni clinici di malattia; più raramente anche nel latte di vacche e di pecore.

Caratteri microscopici.

È piccolissimo, del diametro di $1/3$ μ, dotato di vivacissimi movimenti vibratorî, senza ciglia; rotondo nell'organismo infetto e nelle prime colture artificiali. diviene a poco a poco ellittico, talora abbastanza allungato; si notano allora anche dei corti bastoncini, la cui larghezza resta però sempre di $1/3$ μ. Si colora bene, ma non resiste al metodo del Gram.

Gli individui sono per lo più isolati, ma anche riuniti a due e, più raramente, in file di 4-6.

Colture.

Si coltiva negli ordinari terreni; nelle colture d'isolamento dà formazioni visibili ad occhio nudo soltanto dopo 5-7 giorni; nelle colture di passaggio, specialmente quando è già da un pezzo assuefatto ai sostrati nutritivi artificiali, si sviluppa in modo manifesto già dopo 3 giorni, talora anche in tempo più breve. È un germe insomma che si sviluppa lentamente. Sulle patate non cresce mai, raramente in gelatina; anche su agar a piatto non si sviluppa sempre bene. L'ottimo di temperatura è 37°, il minimo per lo più è 22°, il massimo 40°. Bisogna però avvertire che a 22° lo sviluppo è manifesto solo dopo un mese circa, ed è sempre scarsissimo. Qualche stipite può anche avere un minimo di 18°, ma cresce con ancor maggiore lentezza e meschinità.

È aerobio, con facoltà di anaerobiosi.

Colonie su agar. — Sono rotonde. del diametro massimo di 2 mm., leggermente rilevate, di color grigio, quasi tenuemente bruniccio, con un nucleo centrale distinto, per essere più opaco, dalla parte circostante.

Coltura in brodo. — Intorbidamento leggiero ed uniforme, sedimento scarso, grigio, fioccoso, senza pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina ristretta alla linea di strisciamento, semitrasparente, rilevata, di color grigiobiancastro, quasi tenuemente bruniccio. Talora in vece di una patina continua si ha un insieme di colonie separate: ciò dipende dal numero di germi vitali seminati.

Infissione in agar. — Lungo la linea d'infissione crescono piccole colonie isolate, di color grigio o grigiogiallastro, che finiscono col confluire, impartendo al nastrino che ne risulta un profilo dentellato. In superficie si formano, intorno al punto d'infissione, una o più colonie che confluiscono formando una rosetta.

Infissione in gelatina. — Lo sviluppo a 22° C. è lentissimo, assai più che nell'agar; il più delle volte dopo 2-4 settimane si vede soltanto una piccola colonia in superficie: raramente si ha un nastrino lungo l'infissione, e quando c' è, è sottile, continuo, uniforme. La gelatina non viene fluidificata.

Coltura in latte. — Vi si sviluppa senza coagularlo nè rischiararlo, ma impartendogli una ben netta reazione alcalina.

Vitalità in coltura. — *Il M. melitensis* si conserva a lungo nelle colture artificiali, purchè si facciano frequenti passaggi, in media ogni 8-15 giorni.

Attività biochimiche.

Il *M. melitensis* non attacca nessuna specie di zuccheri nè d'idrati di carbonio in generale.

Nelle colture dà però origine a sostanze alcaline, che aumentano l'acalinità del terreno: il fatto si mette bene in evidenza coltivando il germe in siero di latte Petruschky (v. p. 1255).

Azione patogena.

Il coniglio adulto è in generale poco recettivo all'infezione melitense, però i suoi piccoli possono essere con successo inoculati e soccombere sia ad un'infezione acuta sia ad una cronica. Inoculando il germe per le vene in conigli di 500 gr., questi muoiono in un tempo variabile da 1 a 12 giorni: alla sezione degli animali che muoiono presto si trovano visceri congesti, milza tumefatta con follicoli ingrossati e polpa protrudente rosso-scura. La cavia è più recettiva del coniglio. Facendo l'iniezione nella cavità peritoneale di giovani caviotti, si osserva in loro un progressivo dimagramento, con tumefazione dei testicoli, che si manifesta in 5ª-6ª giornata, e cresce sempre fino a che l'animale muore verso la 12ª giornata circa: all'autopsia congestione dei visceri e vaginalite purulenta bilaterale (Carbone).

Le scimmie inoculate col *M. melitensis* sotto cute o nelle vene, o anche alimentate con cibi inquinati, contraggono una malattia che dura parecchi mesi, con attacchi febbrili ed altri sintomi riproducenti con grande

somiglianza i diversi tipi morbosi che si osservano nell'uomo naturalmente malato. Buona parte delle scimmie infette finiscono col morire, ed all'autopsia dimostrano la milza fortemente ingrossata, di solito anche il fegato discretamente ingrandito, con degenerazione parenchimatosa di esso e d'altri organi, e talora con punti emorragici nella mucosa intestinale. I cocchi specifici si possono dimostrare numerosi nel sangue ed in tutti gli organi e tessuti.

Si ricordano anche casi di febbre mediterranea contratti in laboratorio accidentalmente per mezzo di colture; si ricorda altresì qualche caso positivo d'infezione sperimentale nell'uomo.

Il cane ed alcuni ungulati, fra cui nominiamo le capre, che hanno la maggiore importanza nella trasmissione della malattia all'uomo, sono recettivi all'infezione, però con la restrizione che questa in essi decorre per lo più senza sintomi clinici evidenti; che, ciò non ostante, il loro organismo reagisca all'azione del germe, s'inferisce dalla comparsa di agglutinine specifiche nel loro siero e dalla eliminazione del germe per l'urina e per il latte.

Scordo potè infettare sperimentalmente alcune capre sane della campagna romana, sia inoculando sotto cute sia facendo ingerire colture pure di *M. melitensis.*

Neri osservò con ripetute osservazioni in una capra che, mentre il germe non fu mai coltivabile dal sangue, dall'urina e dalle feci, si potè invece 28 volte su 30 isolare dal latte, che conteneva da 5 a 3500 micrococchi specifici per cmc.; alla sezione gli organi si mostrarono sterili come già il sangue *intra vitam*. Questa osservazione prova che l'infezione può, dopo essere stata generale per un certo tempo, localizzarsi nella mammella soltanto.

Conor ha potuto trasmettere l'infezione alla pecora, in cui del resto Zammit aveva già riconosciuto l'esistenza dell'infezione naturale; inoltre al pollo ed al coniglio, sia per iniezione sottocutanea sia per ingestione, ed al ratto per via sottocutanea.

In tutti questi animali l'evoluzione della malattia è assai lenta, si producono delle agglutinine specifiche, e talora i germi vengono eliminati con l'urina, nella pecora anche col latte.

Il Durham e l'Eyre ottennero un'infezione acutissima nelle cavie mediante l'inoculazione intracranica di colture virulente.

Azione antigena.

Col *Micrococcus melitensis* si possono immunizzare tanto i piccoli animali, come cavie e conigli, quanto animali di mezza taglia, come le capre, ed animali grossi, come il cavallo. Nel siero degli animali immunizzati si possono dimostrare le agglutinine specifiche.

Le esperienze d'immunizzazione negli animali di mezza e grossa taglia sono state fatte nell'intento di ottenere dei sieri curativi. Ma

tanto Wright, che inoculava colture morte, quanto Eyre, che inoculava colture morte e vive, riconobbero che il potere curativo dei sieri ottenuti era quasi nullo.

Trambusti e Donzello pensarono d'immunizzare il capretto non con le colture, ma coi nucleoproteidi estratti secondo il metodo di Lustig e Galeotti, ed ottennero un siero atto ad immunizzare scimmie e piccoli conigli infettati con dosi letali di colture virulente. L'efficacia terapeutica di tal siero provarono gli stessi autori con buon successo anche in malati di febbre mediterranea. A quali sostanze sia dovuta l'azione immunizzante specifica non è ancora bene accertato.

Il *Micrococcus melitensis* ha azione agglutinogena: il siero dei malati di febbre mediterranea ha un potere agglutinante specifico per il *M. melitensis* in diluzioni che variano da 1 : 50 a 1 : 1000 ed anche più. Scordo in due casi ha visto il siero agglutinare anche in diluzioni 1 : 1500 e 1 : 2000.

Anche il siero delle capre infette contiene agglutinine specifiche, attive in diluzioni di 1 : 50-1 : 100, talora anche in diluzioni maggiori. Agglutinine si possono dimostrare sempre nei sieri degli animali immunizzati.

Di questi fatti si profitta nella pratica per la diagnosi serologica della malattia nell'uomo e dell'infezione nella capra.

Sierodiagnosi della febbre mediterranea o reazione di Wright. — Si adoperano a tal uopo patine di fresche agarcolture, che si sospendono in modo uniforme in soluzione fisiologica secondo le norme spiegate a pag. 1317. In una provettina si versa 1 cmc. di questa sospensione batterica, in un'altra 2 cmc., in una terza ancora 1 cmc.: in ciascuna delle prime due si lascia cadere una goccia di siero da una pipetta di 60 gocce per cmc., e si rimescola; la terza provetta resta per controllo. Le provettine si pongono in termostato a 37°; dopo mezz'ora, un'ora, due ore, si osserva se si sono formati dei fiocchettini in una delle due prime provette o in tutt'e due, cioè là dove trovasi il siero, diluito rispettivamente nei rapporti 1 : 60 e 1 : 120. La reazione è positiva allorchè il detto fenomeno in esse è palese, mentre nella provetta di controllo la sospensione si mantiene uniforme. Se, in capo alle due ore, ad occhio nudo non si vede alcun accenno d'agglutinazione, allora si fa l'osservazione in goccia pendente dei tre liquidi: se nei primi due si scorgono gruppetti abbastanza numerosi, composti di 10-20 e più germi, mentre nel secondo tutti gli individui sono isolati, la reazione va dichiarata positiva. L'osservazione microscopica può dunque rivelare un'agglutinazione leggiera o lenta, che l'occhio nudo non può apprezzare dopo due ore.

Abbiamo detto che il siero dev'essere diluito 1 : 60 e 1 : 120. Così dicendo ci troviamo in contrasto con quegli autori che affermano l'esito di una sierodiagnosi della febbre mediterranea essere sicuro soltanto quando il siero sia diluito 1 : 500.

Però il Cippitelli, saggiando il siero di 40 persone sane o affette da malattie differenti dalla febbre mediterranea, non riscontrò mai l'agglutinazione nel rapporto 1 : 50; del pari Soulié e Gardon, fra 122 sieri di persone colpite da malattie diverse, non uno solo ne videro capace di produrre il fenomeno nella diluzione 1 : 30; la medesima cosa ha osservato Gabbi; e lo scrivente stesso, avendo fatto in parecchi anni buona esperienza in questo campo, non può che confermare le osservazioni di questi autori. È ben vero che qualche stipite di *Micrococcus melitensis* si lascia agglutinare da sieri di persone che sicuramente non furono mai affette dalla malattia specifica, mentre nel tubo di controllo il germe rimane in sospensione uniforme; ma ciò è accaduto allo scrivente di osservare anche per altri germi, p. es., per il *Bact. typhi* rispetto alla febbre tifoide: in ogni modo, è sempre un caso raro. Questa possibilità ci deve soltanto far guardinghi circa la scelta dello stipite da adoperare nelle sierodiagnosi: per riconoscerne la bontà bisogna con ricerche preliminari fatte una prima volta, e ripetute ogni tanto, non solo assicurarsi che il germe si faccia bene agglutinare da un siero specifico, e che non presenti il fenomeno dell'agglutinazione spontanea in soluzione fisiologica, ma che sia altresì incapace di agglutinarsi in presenza di sieri normali.

Quando si rispettano queste precauzioni, l'esito della sierodiagnosi eseguita con siero diluito 1 : 60 deve essere considerato sicuro. La ragione per cui si consiglia di allestire due prove, una alla diluzione 1 : 60, l'altra ad 1 : 120, è questa, che talora si ha l'agglutinazione ben manifesta con la seconda diluzione, non con la prima, cioè si ha il fenomeno paradosso, che, anche per il *M. melitensis*, oltre che per il B. del tifo, lo scrivente ha avuto occasione di verificare qualche volta nettissimo.

Recentemente Nicolle e Comte hanno visto che il siero di 45 fra 68 individui affetti di tifo esentematico, malattia causata da un virus filtrabile, dimostrava potere agglutinante sul *M. melitensis* fino alla diluzione 1:50; solo in un caso anche fino a 1:100. Questo fatto costituisce, se mai, una ragione di più in favore della regola di far sempre uso delle due indicate diluzioni.

Le agglutinine specifiche compaiono nel siero umano già verso la 5ª-6ª giornata di malattia, presentano oscillazioni quantitative per tutta la durata di questa, e permangono per alcuni mesi dopo avvenuta la guarigione definitiva.

Un potere agglutinante specifico si riscontra anche nel siero delle capre infette, sicchè la reazione di Wright è valevole anche in questo caso, come accertamento diagnostico necessario per l'attuazione di razionali provvedimenti profilattici.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento del *M. melitensis* si può fare, nel malato, dalla milza, dal sangue, dall'urina.

Nel primo caso si punge l'organo, con tutte le regole dell'asepsi, con un lungo ago-cannula, inserito all'estremità di una siringa, che serve per fare l'aspirazione; il materiale semifluido si ricaccia in tubi di brodo sterile o in tubi di agar solidificato a becco di clarinetto. Le colture si pongono a 37°, alla qual temperatura si mantengono per 8-10 giorni, poichè, com'è stato detto, il *M. melitensis* ha in primo isolamento uno sviluppo lentissimo.

Per isolarlo dal sangue, se ne prelevano 3-5 cmc. da una vena del braccio, mescolandoli subito con un liquido anticoagulante, e poi distribuendo la miscela nei terreni di coltura.

Per isolarlo dall'urina, come anche dal latte delle capre, bisogna raccogliere in modo sterile i detti liquidi, e seminarne 0.5-1 cmc. in varie provette di brodo o di agar.

Non essendo raccolti sterilmente i liquidi, bisogna ricorrere alle colture a piatto; ma in tal caso la probabilità di buon successo è minore, sia perchè, com'è stato detto, il *M. melitensis* talvolta cresce male nelle piastre, sia perchè, pur potendo nascere delle colonie, queste possono essere sopraffatte o mascherate dai germi saprofiti concomitanti.

L'identificazione del *M. melitensis* non offre gran difficoltà, poichè non si conoscono altri germi aventi i suoi caratteri. In ogni modo si può ricorrere anche alla prova dell'agglutinazione, usando un siero specifico molto attivo.

Streptococcus pathogenes longus.

Sotto questo nome comprendiamo i vari streptococchi patogeni isolati in diverse malattie dell'uomo, e considerati nel passato come specie distinte. Intendiamo di riferirci allo *Streptococcus erysipelatos* scoperto da Fehleisen nel 1883 come causa dell'erisipela, allo *Str. pyogenes* scoperto da Rosenbach nel 1884 come causa di flemmoni ed ascessi, allo *Str. febris puerperalis* scoperto nel 1880 da Doléris e Arloing in casi di febbre puerperale: insieme con essi vanno considerati lo *Str. scarlatinosus* di Moser, germe che, contrariamente al nome che porta, non è causa della scarlattina, e gli streptococchi dalle lunghe catene isolati in casi di angina e di setticemia.

Tutti gli streptococchi nominati appartengono, come sarà spiegato più oltre, ad una unica specie, per cui accettiamo la denominazione di *Streptococcus pathogenes longus*, del quale qui si dànno i caratteri principali.

Si trova nell'uomo malato, in casi di flogosi con o senza esito in suppurazione, in casi di erisipela, di febbre puerperale, di setticemia, di angina follicolare, di linfangite, di bronchite e polmonite, più raramente di pleurite, pericardite, meningite, osteomielite. È stato anche isolato in alcune forme di reumatismo, mielite, polinevrite, nefrite.

Lo streptococco è spesso associato allo stafilococco, al bacillo della difterite e al virus della scarlattina; può complicare la tubercolosi polmonare.

Negli animali s'incontra come causa di suppurazione e dell'adenite equina.

Ostertag in occasione di una piccola epizoozia di aborti infettivi nelle cavalle, ha isolato dal pus dei genitali uno streptococco, il quale in nulla differisce dallo *Str. pathogenes longus:* l'autore nota soltanto che il germe mostrasi spesso incorporato nei leucociti, e questo non è certo un carattere differenziale.

Nell'uomo sano trovasi nelle stesse parti indicate per lo stafilococco: sulla cute però con molto minore frequenza.

Caratteri microscopici.

Individui rotondi, del diametro medio di 0.6 - 0.8 μ, riuniti in catene più o meno lunghe, di 10-20 e più articoli, accanto alle quali si trovano sempre poche coppie e qualche forma isolata (v. fig. 509). Le catene sono più lunghe nei terreni liquidi; nei solidi sogliono essere più corte e talora aggrovigliate in maniera da mentire, ad un'osservazione superficiale, i grappoli dello stafilococco.



Fig. 509. — Streptococco.

Negli essudati e nei tessuti le catene sono sempre corte, di 8-12 elementi.

Lo streptococco si colora bene con tutti i colori basici d'anilina, e resiste al metodo del Gram.

Colture.

Si coltiva bene in tutti i terreni, ma con più lentezza e meno rigoglio dello stafilococco.

Il suo ottimo di temperatura è 37°, il minimo 18°, il massimo 45°. È aerobio, ma si coltiva anche in anaerobiosi; anzi alcune forme, specie quelle che si isolano dalla vagina, prediligono la seconda condizione.

Qualche razza di streptococco produce un pigmento che va dal giallo bruno al rosso sanguigno (Kruse e Pasquale).

Colonie in agar. — Ad occhio nudo le colonie superficiali sono piccolissime, sottili, semitrasparenti, piane, rotondeggianti, bianchicce.

A piccolo ingrandimento dimostrano il contorno rotondeggiante regolare o leggermente ondulato o dentellato o sfrangiato, ed hanno

struttura punteggiata o finamente granulosa e colore grigio o grigio-giallastro.

Le colonie profonde hanno forma di cote, colore più scuro e struttura granulosa più grossolana.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar, salvo che sono più piccole e di colore più chiaro.

Manca la fluidificazione.

Colture in brodo. — La maggior parte degli stipiti lasciano il brodo limpido e dànno un sedimento compatto tra il granuloso e il fioccoso; altri stipiti intorbidano il brodo leggermente ed in modo uniforme, formando sempre un sedimento di aspetto uguale agli altri. Non vi è pellicola in superficie. Si è notato più volte che nei brodi rimasti limpidi le catene sono più lunghe di quelle che si trovano nei brodi torbidi.

Uno stesso stipite, mantenuto per successivi passaggi in terreni di coltura, ora può dare brodi limpidi, ora torbidi.

Strisciamento su agar. — Patina continua o discontinua, cioè costituita da un fitto insieme di colonie simili a quelle già descritte. Quando è continua, è sottile, semitrasparente, grigiobiancastra, con superficie non perfettamente liscia, e lungo i margini presenta quasi sempre piccole colonie isolate.

L'acqua di condensazione ha i caratteri della brodocoltura.

Colture in latte. — Lo streptococco si sviluppa nel latte, producendo acido lattico dal lattosio e trasformando il liquido in un coagulo per lo più compatto, in capo a 3-4 giorni.

Strisciamento su patata. — Lo streptococco si sviluppa male sulla patata, dando sul tratto di strisciamento come una tenuissima verniciatura, appena visibile: talora non vi cresce per nulla; ben di rado vi nasce con una patina ben evidente.

Vitalità in coltura. — Lo streptococco nelle colture si mantiene vitale solo durante poche settimane. Più a lungo si conservano le colture in gelatina sviluppate a 22°, e poi tenute a bassa temperatura: la vitalità ed anche la virulenza loro si prolunga in tal modo per mesi.

Attività biochimiche.

Produce poco idrogeno solforato, niente indolo. Dal glicosio e dal lattosio produce in genere piccole quantità di acidi; alcune razze anche gas, precisamente acido carbonico, talora anche idrogeno: fra gli acidi non manca mai l'acido lattico, sia il levogiro, sia l'inattivo.

Coltivato in anaerobiosi dimostra potere fibrinolitico, producendo acidi grassi ed amine.

Azione patogena.

Accade non di rado che lo streptococco appena isolato sia poco o punto virulento; e quando è virulento, si attenua rapidamente nelle colture artificiali. La virulenza può essere esaltata per una serie di passaggi attraverso l'organismo animale, specie del topo; Marmorek ottenne così delle colture che nella quantità di cmc. $^1/_{1000}$ - $^1/_{10000}$ uccidevano il topo. Per conservare la virulenza, lo stesso Marmorek coltivò lo streptococco in una miscela di due parti di siero umano o di cavallo ed una di brodo. Però uno streptococco reso artificialmente virulentissimo per il topo non è più virulento per il coniglio.

Fra i piccoli animali, i più recettivi si dimostrano il topo ed il coniglio, meno il ratto e la cavia. I grossi animali domestici, gli ovini, e più ancora gli equini, sono poco recettivi alle infezioni streptococciche, mentre l'uomo vi è molto soggetto.

Sperimentando nel topo e specialmente nel coniglio, si son potute riprodurre quasi tutte le forme di malattia che lo streptococco produce naturalmente.

Veleni.

Lo streptococco non produce esotossine; e gli studi finora fatti per ottenere delle endotossine o sono falliti, o hanno provato che esse non sono mai così potenti da essere paragonate a quelle di altri germi. Tanto i filtrati di brodocolture, quanto i corpi batterici uccisi col cloroformio o col calore, inoculati anche in gran quantità nei conigli, rimangono senza effetto (De Giaxa e Pane, von Lingelsheim ed altri). Qualche risultato positivo ebbe Aronson coltivando lo streptococco in brodo di carne equina con 0.1 % di zucchero, ed inoculando le colture uccise col cloroformio o col riscaldamento a 70°. Solo a Macfadyen e Rowland è fino ad ora riuscito di uccidere in poche ore la cavia, inoculandole nel peritoneo cmc. 0.1 di un estratto batterico al 10 %, preparato da colture fresche col metodo dell'aria liquida (v. p. 1302).

Parecchi stipiti di streptococco hanno potere emolitico, dovuto ad una emolisina, che dicesi streptolisina: secondo Schottmüller tale potere emolitico, saggiato sul sangue umano, può considerarsi come indice di virulenza, avendolo egli sempre dimostrato intenso negli streptococchi isolati da casi di grave infezione, mentre fu trovato mancante o solo presente in leggerissimo grado negli streptococchi ottenuti da casi d'infezione lieve.

Alcuni stipiti di streptococco hanno inoltre un forte potere leucocida, dovuto, secondo van de Velde, ad una leucocidina.

Unicità di specie degli streptococchi patogeni.

Tutto ciò che è stato descritto vale non solo per gli streptococchi isolati da ascessi o da flemmoni, ma anche per quelli dell'eresipela e della febbre puerperale. Le piccole differenze morfologiche e colturali che furono addotte in principio da vari autori per istituire le tre specie *Streptococcus pyogenes*, *Str. erysipelatos*, *Str. febris puerperalis*, sono inconstanti, e sono state anche osservate fra stipiti diversi tutti isolati in casi di erisipela, o tutti in casi di febbre puerperale, o tutti in casi di flemmoni o ascessi. Si aggiungano le notizie concernenti infezioni erisipelatose prodotte nell'uomo, per contagio, da streptococchi provenienti da malate di febbre puerperale, o febbri puerperali causate da streptococchi esistenti, anche in minimi focolai suppurativi, nelle dita delle levatrici, ed ogni dubbio si attenua circa l'identità di *specie* di questi streptococchi.

Se è vero che Fehleisen riprodusse nella pelle del padiglione auricolare del coniglio un'infiammazione erisipelatosa, inoculando il suo streptococco isolato da casi di erisipela, è anche vero che lo stesso potè poi ottenersi inoculando streptococchi di tutt'altra provenienza.

Conchiudiamo che gli streptococchi isolati nelle dette manifestazioni morbose costituiscono una sola specie, per la quale appunto è stato di recente proposto il nome di *Streptococcus pathogenes longus*; e che neppure si possono considerare come differenti varietà patogene di essa, aventi cioè caratteri distintivi, sia pur lievi, ma ben determinati verso la corrispondente malattia.

Ciò per altro non toglie che vi possano essere delle varietà definibili rispetto ad altro argomento, cioè rispetto ai fenomeni immunitari; e poichè siffatta questione ha un addentellato con la terapia specifica delle infezioni streptococciche, mette conto soffermarvisi alquanto.

Gli streptococchi hanno potere agglutinogeno, e sono in generale specificamente agglutinati dal siero di animali immunizzati.

Ora supponiamo di avere tre stipiti *A*, *B*, *C* di *Streptococcus pyogenes*, ed un siero agglutinante ottenuto immunizzando un animale con lo stipite *A*: il titolo di questo siero verso lo stipite *A* sia 10,000. Il siero può non agglutinare gli stipiti *B* e *C*, oppure può agglutinarli in una diluzione molto inferiore a 10,000 p. es. di 100-200, e l'uno in una diluzione minore dell'altro.

Ciò prova che i tre stipiti, pur essendo tutti e tre provenienti da focolai suppurativi e identici in tutti gli altri caratteri, sono differenti per ciò che spetta all'apparato dei loro recettori agglutinabili o agglutinogeni, che è tutt'uno. La stessa cosa può ottenersi studiando comparativamente più stipiti provenienti sia da casi di erisipela, sia di febbre puerperale, sia di angina. Naturalmente accade anche tal-

volta che uno o più degli stipiti eterologhi si comportino rispetto al siero agglutinante come lo stipite omologo.

Lo *Streptococcus pathogenes longus* dunque comprende un gruppo di varietà, dirò così, agglutinatorie: ciò vale per gli stipiti recentemente isolati dall'uomo.

Se però più stipiti si passano prima molte volte per il corpo del coniglio o del topo, e poi con uno di essi si immunizza un animale, e si saggia il potere agglutinante del siero ottenuto su tutti gli stipiti presi a studiare, la diluzione limite si mostra presso a poco uguale per tutti. Dunque, per l'adattamento graduale alla vita in organismi di una data specie animale, streptococchi originariamente diversi sotto l'aspetto che stiamo considerando, finiscono con l'uniformare i loro recettori agglutinabili od agglutinogeni.

Con metodo simile studiando il potere antibatterico *in vivo* dei sieri di animali immunizzati con uno stipite di streptococco, si notano a un dipresso gli stessi fatti. Nel caso di streptococchi di recente isolamento dall'uomo, il siero ha notevole potere immunizzante rispetto allo streptococco omologo, leggiero o nullo rispetto agli eterologhi; uguale press'a poco per tutti nel caso di streptococchi passati molte volte successive nel corpo animale.

Azione antigena.

Nella breve discussione precedente è stato ricordato quanto concerne il potere agglutinogeno degli streptococchi, e si è accennato anche implicitamente alle proprietà immunizzanti che i sieri antistreptoccici posseggono.

Tali sieri sono stati ottenuti immunizzando dei cavalli con uno o più stipiti di recente isolamento, o con uno o più stipiti resi virulentissimi per mezzo di successivi passaggi nel corpo degli animali. I sieri che sono in commercio possono essere aggruppati nel seguente modo: sieri ottenuti per immunizzazione con un solo stipite di passaggio, quale è quello di Marmorek; sieri ottenuti per immunizzazione con più streptococchi appena isolati dall'uomo, quali sono il siero di Tavel ed il siero antiscarlattinoso di Moser; sieri ottenuti per immunizzazione con più streptococchi di fresco isolati, insieme con altri di passaggio, quali sono i sieri di Aronson e di Ruppel.

Per intendere la ragione del succedersi di tanti e molteplici sforzi allo scopo di ottenere sieri antistreptococcici applicabili alla cura delle infezioni omonime, bisogna rammentare che gli streptococchi appena isolati dall'uomo sono poco virulenti per gli animali, quindi riesce difficile immunizzare verso di loro intensamente un sieroproduttore; inoltre che gli stipiti di passaggio, se esaltano la loro virulenza rispetto alla specie animale a ciò adoperata, non sono per questo più virulenti rispetto all'uomo, anzi si ha ragione di ammettere il contrario. Da un

lato dunque, per ottenere sieri efficaci, bisognerebbe usare stipiti artificialmente esaltati nella virulenza, perchè con questi si possono iperimmunizzare gli animali sieroproduttori; ma tali sieri, se sono ricchi di anticorpi rispetto ai germi esaltati, pochi ne contengono rispetto agli streptococchi quali si trovano nel corpo umano infetto, essendo, come abbiamo detto, mutato per i successivi passaggi il loro apparato recettorale. Inoculando più stipiti recentemente isolati, si ha il vantaggio di una molteplicità di anticorpi, quale si richiede per un'applicazione generale della sieroterapia antistreptococcica; ma essendo gli stipiti in tal caso avirulenti o poco virulenti, riesce difficile una iperimmunizzazione degli animali; quindi il vantaggio di ottenere molti anticorpi differenti è diminuito dallo svantaggio di avere scarsa quantità di ciascuno. Per annullare tale svantaggio Aronson pensò appunto di mescolare i sieri di più animali immunizzati con diversi stipiti: il siero di ciascun cavallo contiene gran quantità di alcuni anticorpi, e la miscela conterrà gran quantità di tutti gli anticorpi. I sieri multiparziali e polivalenti, com'è quest'ultimo di Aronson, avrebbero dunque, per le considerazioni fatte, una più grande probabilità di riuscire efficaci.

Isolamento e identificazione.

Per il prelevamento ed i trattamenti preliminari del materiale, valgono le regole generali esposte a p. 1258.

Il terreno da scegliere per l'isolamento è l'agar, il cui vantaggio risulta più chiaro pensando che non poche volte lo streptococco trovasi commisto con lo stafilococco nei prodotti morbosi e negli organi; onde, facendo l'isolamento in piastre di gelatina, lo stafilococco, crescendo più rapidamente e fluidificando il sostrato, potrebbe rendere più difficile lo sviluppo libero delle colonie di streptococco, specie se di questo vi sono relativamente pochi individui nel materiale da seminare.

L'identificazione dello *Streptococcus path. longus* è relativamente facile. Bisogna però tener presente l'esistenza di altre specie di streptococchi, che possono avere la maggior parte dei caratteri comuni con lo *Streptococcus path. longus.*

In generale lo *Streptococcus path. longus* dà catene lunghissime e non intorbida il brodo: se queste due proprietà fossero costanti, potrebbero essere accolte come criteri diagnostici rispetto agli streptococchi che hanno catene brevi e intorbidano il brodo. Ma così non è; perciò bisogna ricorrere ad altri caratteri.

Le principali forme da considerare sono lo *Str. mitior s. viridans* e lo *Str. mucosus.*

Secondo Schottmüller essi distinguonsi dallo *Str. longus* sopra tutto per l'aspetto degli strisciamenti su agar con sangue; mentre questo dà patine grige circondate da un alone chiaro, lo *Str. mitior* dà patine di color grigio-verdognolo più o meno scuro, senza alone circostante, e lo

Str. mucosus dà patine grigio-verdognole piuttosto spesse e di aspetto mucoso, che appaiono circondate da un sottile alone chiaro soltanto dopo parecchi giorni. Inoltre le catene dello *Str. mucosus* al microscopio si vedon circondate da un' ampia capsula, che manca sempre allo *Str. path. longus*. Bisogna tuttavia aggiungere che capitano rari casi in cui il differenziamento riesce malsicuro.

Streptococcus equi.

È causa dell'adenite equina, e fu visto la prima volta in questa malattia dal Rivolta nel 1873. Schütz ed altri lo isolarono dai prodotti morbosi; Baruchello l'ottenne dal sangue dei cavalli malati insieme con lo stafilococco. Da molti autori fu ed è tenuto come specie differente dagli altri stafilococchi. Altri però credono che sia uno streptococco piogeno, e le conclusioni di un recente studio del Pricolo e di uno consecutivo del Marxer sono conformi a tale idea. La disparità d'opinioni si spiega tenendo presente che le differenze notate fra lo *Streptococcus equi* e lo *Streptococcus pathogenes longus* non sono essenziali, ma transitorie e dovute più che altro a fenomeni di adattamento. Esso dà in genere catene corte, cioè di 8-12 individui, i quali con una certa frequenza dimostrano anche una divisione in senso parallelo alla catena: esso è quasi sempre virulento, anche appena isolato, per i piccoli animali di laboratorio. Ora i caratteri morfologici possono estinguersi, e la virulenza iniziale può essere spiegata senza difficoltà pensando alla provenienza equina e non umana, cioè da tutt'altra specie animale. Fu, è vero, visto che il suo comportamento verso le reazioni immunitarie è diverso, ma anche questa non è buona ragione per farne una specie a sè, quando si rifletta che vari stipiti dello *Streptococcus pathogenes longus* fanno lo stesso.

Baruchello immunizzò il cavallo verso lo *Strept. equi*, inoculandogli essudati pleurici di cavie e conigli, infettati sperimentalmente con lo stesso germe; in principio inoculava essudati resi sterili con l'aggiunta del 3 % di toluolo, poi essudati intatti. È in sostanza un processo d'immunizzazione antiaggressinica, per effetto della quale il cavallo può impunemente ricevere 30-40 gr. di essudato virulento o 100-200 gr. di brodocoltura. Il cavallo produce un siero antistreptococcico attivissimo, che secondo Pricolo agisce per batteriotropine, e la cui azione, secondo lo stesso autore, si dimostra bene e si dosa nel coniglio, in cui cmc. 0.1 di siero neutralizza 10 dosi letali di streptococco.

Streptococcus agalactiae.

È causa della mastite, sporadica o epizootica, delle vacche e delle capre. Trovasi nel latte, il quale vien segregato scarsamente, ha colore giallognolo, contiene coaguletti fioccosi e spesso bollicine di gas. Mancano studi comparativi sufficienti ad asserire l'identità o la differenza fra questo e lo *Streptococcus pathogenes longus*. Ci restringiamo a dire che ha caratteri simili a questo, salvo che non resiste al metodo del Gram; lo scrivente ha avuto occasione di verificare in due casi questa proprietà, ma ha visto altresì che dopo molti

passaggi in terreni di coltura artificiali diviene resistente come lo *Streptococcus pathogenes longus*. Forma catene di straordinaria lunghezza; per lo più scompone il glicosio e il lattosio, con abbondante produzione di gas, precisamente CO_2, ma non idrogeno, e con formazione di acido paralattico destrogiro.

Parecchi altri streptococchi più o meno somiglianti a questo si possono trovare nel latte, senza che provenga da mucche malate di mastite: *Streptococcus acidi lactici, tyrogenus, albidus, magnus* ed altri, i quali tutti hanno comune la proprietà di scindere il lattosio in acido lattico, alcuni anche con produzione di gas, in modo che i formaggi risultano attraversati da gran numero di bolle gassose.

Enterococco.

Questo germe, che in fondo è uno streptococco e che porta il nome di Thiercelin, si può trovare nelle feci normali, più spesso in quelle di persone malate di enterite o di enterocolite.

Si presenta in coppie di elementi ellittici o in corte catene, e nelle feci dei malati è anche capsulato. Dalle feci normali si isola difficilmente, facilmente da quelle dei malati: si sviluppa in tutti i terreni di coltura e, benchè abbia l'ottimo di temperatura a 37°, cresce bene anche a temperatura di stanza. Intorbida il brodo.

L'enterococco pare si accosti, per le sue proprietà, allo *Streptococcus mucosus* piuttosto che allo *Streptococcus longus*.

Streptococcus lanceolatus

o *Diplococco della polmonite, Diplococco capsulato, Diplococco lanceolato, Pneumococco, Diplococco della setticemia salivare.*

Fu già nel 1881 visto da Pasteur nella saliva di un ragazzo morto di rabbia, e ne fu riconosciuta la squisita azione patogena per il coniglio; fu descritto nel 1883 da Talamon nell'essudato pneumonitico; nel 1885 fu da Fränkel messo in rapporto etiologico con la polmonite; fu coltivato con sicurezza e identificato posteriormente da Weichselbaum.

È causa della polmonite cruposa nell'uomo, come anche di pleurite, pericardite, endocardite, peritonite, meningite, otite, e del così detto *ulcus serpens corneae*.

È stato trovato anche nel sangue, durante il corso di alcune infezioni pneumococicche (Panichi, Eichhorst ed altri).

Si può dimostrare nella saliva, non solo dei convalescenti di pneumonite, ma anche di persone sane, che non soffrirono mai di tale malattia (portatori di pneumococchi).

Caratteri microscopici.

Nello sputo ed in altri prodotti morbosi si presenta per lo più in coppie, di cui ciascun elemento tipicamente ha la forma ovale, col polo minore assottigliato, sicchè somiglia ad una lancetta o ad una fiammella: i due individui sono affacciati per il polo ottuso (v. fig. 510). Talora però la forma è semplicemente ellittica, più di rado rotonda. S'incontrano anche delle catenelle di 4-6 elementi. Ogni coppia od ogni catenella è circondata da una capsula più o meno spessa. S'incontrano talvolta delle coppie anche nel protoplasma dei leucociti.



Fig. 510.
Pneumococco.

Nelle colture in terreni comuni le forme allungate dànno luogo alle rotonde, le catene si dimostrano composte di 8-12 individui, le capsule scompaiono. Nelle colture fatte in muco tracheale sterilizzato o in siero liquido di coniglio, le capsule ritornano; come si ripresentano anche, e con maggiore evidenza, nell'organismo dei topi inoculati con le colture ordinarie.

È immobile, si colora bene anche col metodo del Gram.

Colture.

È aerobio, ma può vivere anche in anaerobiosi.

L'ottimo di temperatura è 37°, il massimo 42°, il minimo 25°. È raro che qualche stipite si sviluppi anche a 22°-23°, ma con assai lentezza.

Cresce nei comuni terreni di coltura; ma appena isolato nasce bene per lo più soltanto in sostrati con siero o altri liquidi contenenti sostanze proteiche. Si prestano bene il siero di sangue di bue o di coniglio mescolato col brodo nel rapporto 1 : 2, il siero solidificato, l'agar con siero o l'agar ascitico glicerinato al 5 %, l'agar con sangue.

Non dà mai sviluppo sulla patata.

Colonie in agar. — Le superficiali sono rotondeggianti, hanno un diametro al più di 1-2 mm. dopo 3 giorni, sono sottili, trasparenti, lisce, di color grigio tenue.

A piccolo ingrandimento dimostrano un contorno regolare, talora leggermente sfrangiato, sono finamente punteggiate, incolore.

Le profonde sono rotondeggianti o a cote, piccolissime, quasi opache, granulose.

Colonie in gelatina. — Quando nascono, il che accade raramente, somigliano a quelle in agar, salvo che sono ancora più piccole e più sottili ed il contorno suole essere più costantemente regolare e quasi indistinto. Non vi è mai fluidificazione.

Coltura in brodo. — Intorbidamento lievissimo o mancante, con sedimento fioccoso soffice, senza pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina esilissima, trasparente, di color grigio tenue, poco lucente, quasi appannata.

Strisciamento su siero solidificato. — Patina più rigogliosa che su l'agar; essa ha inoltre un aspetto leggermente mucoso.

Infissione in gelatina. — Quando lo sviluppo avviene, si presenta in forma di un nastrino sottile o di una filza di coloniette lungo il tramite d'infissione. In superficie una piccolissima colonia, non sempre; la fluidificazione manca.

Coltura in latte. — Lo pneumococco si sviluppa nel latte acidificandolo debolmente, e coagulandolo quasi sempre.

Colonie in agar ascitico glicerinato. — Sono colonie più rigogliose di quelle che nascono in agar, hanno contorno rotondeggiante, regolare o lobato, e quando invecchiano si mostrano fortemente granulose, in maniera da assumere aspetto morulare.

Coltura in brodo con siero di sangue. — Lo sviluppo è più rigoglioso che nel brodo comune, ma i caratteri colturali sono gli stessi.

Resistenza in coltura. — La vitalità nelle colture ordinarie è breve, di pochi giorni, salvo casi rari; la virulenza scade in misura notevole e rapidamente. Nel sangue estratto da conigli infetti e defibrinato, e tenuto al freddo e all'oscuro, lo pneumococco rimane vitale e virulento per parecchi mesi.

Un comportamento singolare di fronte a tutti gli altri batteri è quello che gli pneumococchi dimostrano verso la bile sterilizzata, come per primo ha visto Neufeld. Questa ne discioglie in pochi minuti i corpi, come si riconosce facilmente aggiungendone parecchie gocce ad una brodocoltura: la quale si fa rapidamente limpida, e l'osservazione microscopica prova che la chiarificazione è dovuta ad un vero e proprio dissolvimento dei corpi batterici. In alcune colture vi sono però talora degli individui che sfuggono a tale azione, come anche si sono viste colture di qualche stipite resistervi quasi interamente.

Attività biochimiche.

Lo pneumococco in genere non attacca gl'idrati di carbonio; ma alcuni stipiti in certe condizioni possono più o meno lentamente produrre acidi dal glicosio, più raramente dal lattosio, dal raffinosio, dall'amido solubile, talora anche dalla mannite e dalla glicerina. Coltivato in brodo con sangue bovino, cui siasi aggiunto 1 % d'inulina (terreno di Hiss), produce acidi e coagula il sostrato: secondo Hiss, questo sarebbe un carattere costante.

Casagrandi ha dimostrato, mediante la prova bioscopica di Neisser e Wechsberg, che lo pneumococco produce leucolisine solubili, quindi filtrabili. Per effetto di tale potere leucolitico, nell'organismo infetto ven-

gono distrutti molti leucociti; dal loro corpo si libera il nucleoistone, che secondo Carbone si scinde in nucleina ed istone, e questo ha proprietà tossiche: si tratta quindi di un veleno secondario (v. pag. 1405).

Lo pneumococco, a differenza dello streptococco piogeno, non ha potere emolitico, ma nei terreni di coltura con sangue produce una modificazione dell'emoglobina, per la quale si manifesta una colorazione verde di foglia morta.

Azione patogena.

Il coniglio e il topo sono i più recettivi, viene poi il ratto; quasi refrattari sono la cavia, il cane, gli uccelli.

Piccole quantità di coltura virulenta, iniettate sotto cute nel topo o nel coniglio, li conducono a morte per setticemia in 12-24 ore, nel coniglio alcune volte soltanto dopo 48-72 ore. Le iniezioni intravenose, nel coniglio, hanno effetto più rapido. Inoculando colture poco virulente nella pleura o nel peritoneo del coniglio, o facendogli inalare delle colture secche e polverizzate, si possono rispettivamente ottenere una pleurite, una peritonite, una pneumonite diplococciche.

La virulenza dello pneumococco diminuisce notevolmente e scompare ben presto nelle colture artificiali, già alla 3ª-4ª generazione. Invece nel sangue dei conigli sperimentalmente infettati, raccolto in pipette, da chiudersi alla lampada, lo pneumococco mantiene la sua virulenza per molto tempo (Foà). Anche la conserva a lungo se viene seminato nelle uova fresche, previa disinfezione del guscio (v. p. 1250), e le uova si tengano 2-3 giorni a 37° e da ultimo si spalmino di vernice coppale (Sclavo).

Si può far ricuperare allo pneumococco la virulenza diminuita o perduta inoculando nel coniglio una forte quantità di brodocultura insieme con altrettanto filtrato di una brodocoltura di *Bact. vulgare:* l'animale muore, ed il sangue contiene il germe virulento. L'aumento di virulenza si ottiene anche facendo successive inoculazioni nell'organismo del coniglio.

Il Foà, studiando l'azione patogena dei diplococchi di provenienza diversa, riconobbe due varietà. Una di esse, inoculata sotto cute nel coniglio, produce nel punto d'inoculazione un edema, che infiltra le parti circostanti, ma non è mai diffuso per una grande estensione del sottocutaneo, e conduce l'animale a morte con edema del mediastino, con milza e reni semplicemente congesti, e senza o con pochissimi diplococchi nel sangue. L'altra varietà, inoculata per la stessa via, non dà localmente edema, e fa morire il coniglio con milza ingrandita, scura e dura, per la formazione di coaguli intravasali, con gravi lesioni dei glomeruli renali, e con numerosi diplococchi nel sangue. La prima varietà fu chiamata dal Foà *edematogena* o tossica, la seconda *fibrinogena* o settica. Tale distinzione fu trovata giusta da parecchi autori, e chiunque inoculi questo germe nei conigli può farne esperienza: vi sono tuttavia degli stipiti di pneumococco che si comportano in maniera da fare ammettere l'esistenza di gradi intermedi fra i due estremi reperti carat-

teristici, se pur non si voglia ammettere che tali stipiti rappresentino sempre una mescolanza delle due varietà. D'altra parte è stato osservato che le due varietà, inoculate successivamente da coniglio a coniglio, conservano costanti le loro proprietà patogene distintive, ma solo fino a un certo punto e non in modo assoluto.

Tizzoni e Panichi hanno definito anche una varietà nevrotossica di pneumococco, la cui azione patogena si esplica anche e sopra tutto sul sistema nervoso, con fenomeni paralitici ed atassici.

Veleni.

La tossicità delle brodocolture filtrate o riscaldate a 60°, oppure trattate con cloroformio o con fenolo, è piccolissima: occorrono parecchi cmc., 5-30, per produrre uno stato febbrile nel coniglio, ed assai più per ucciderlo; e non è gran che maggiore la tossicità delle colture in siero. Foà e Carbone ottennero dalle colture precipitate con solfato d'ammonio una sostanza che nei conigli spiegò un'azione marantica. Macfadyen, triturando i corpi batterici congelati, e poi dissolvendoli in una soluzione di potassa 1 °/₀₀, ebbe una sostanza tossica per la cavia; ma si tratta sempre di un grado relativamente debole di tossicità. Più attivi sono, secondo Kruse e Pansini, gli estratti di sangue e di organi degli pneumonitici.

Possiamo dunque dire che lo pneumococco non produce esotossine, e che fino ad ora non si è riusciti neppure ad estrarre endotossine in quantità rilevante dalle colture artificiali.

Solo Tizzoni e Panichi, coltivando in un brodo speciale o in sangue defibrinato di coniglio la loro varietà di pneumococco, osservarono una forte azione tossica, per cui l'animale inoculato comincia a febbricitare poco dopo l'iniezione, si dimostra abbattuto e sonnolento, presenta uno stato d'ambascia, una paresi spastica o flaccida degli arti posteriori, e diarrea sanguinolenta. La sostanza tossica ammessa da Tizzoni e Panichi ha dei caratteri che l'accostano in certo qual modo a quelle sostanze che sogliono comprendersi oramai sotto il nome di aggressine.

Azione antigena.

Per avere felicemente superato un'infezione pneumococcica, l'uomo acquista una certa immunità specifica, però spesso non durevole: infatti è noto che la pneumonite cruposa può ritornare più d'una volta in una stessa persona.

Sperimentalmente così G. e F. Klemperer, come Foà e Carbone ed altri, poterono immunizzare dei conigli rispetto allo pneumococco; il siero di questi animali impedisce l'infezione nei conigli, anche quando è inoculato 5-24 ore dopo l'iniezione del virus. A Pane si devono gli studi

più completi su questo argomento: egli potè immunizzare l'asino con uno pneumococco virulentissimo, ed ottenerne un siero che nella quantità di 0.75 cmc., iniettato nelle vene, è capace di salvare dall' infezione i conigli inoculati con 20 dosi letali di coltura di pneumococco.

Roemer prepara un siero antipneumococcico multiparziale e polivalente, immunizzando con diversi stipiti virulenti cavalli, vitelli e pecore, e poi mescolando i sieri di questi animali.

Il siero Pane e il siero Roemer ed altri sieri preparati altrove da più autori, sono stati adoperati nella cura della polmonite e dell' *ulcus serpens corneae.*

Tizzoni e Panichi immunizzarono degli animali prima con filtrati di colture in brodo speciale, poi contemporaneamente, ma per iniezioni separate, col siero di animali precedentemente immunizzati con gli stessi filtrati e con colture di pneumococco in brodo speciale. Il siero degli animali trattati con questo procedimento di sierovaccinazione ha potere agglutinante specifico e non ha potere battericida; ma in dosi di 0.25-0.50 cmc. per chilo è capace di salvare gli animali da infezioni sicuramente e rapidamente letali, anche se inoculato parecchie ore dopo l'iniezione del virus. Recentemente Tizzoni ha ottenuto un siero attivo anche in dosi di 0.06 cmc. (Puntoni).

Circa il meccanismo dell'azione immunizzante e curativa dei sieri antipneumococcici, Neufeld crede più che altro alla efficacia delle batteriotropine contenutevi.

Tizzoni e Panichi, almeno per ciò che riguarda il loro siero, riconoscono un'azione antitossica.

È stata anche provata nella polmonite la terapia wrightiana (Schupfer, De Marchi ed altri).

Diagnosi batterioscopica.

Per la *diagnosi batterioscopica* della polmonite il procedimento più sicuro è quello di colorare degli strisciamenti di espettorato, fatti su portoggetti, col metodo del Gram, facendo seguire una colorazione di contrasto con l'eosina. La presenza degli elementi caratteristici, disposti in coppie o in brevissime catene di 4-6, circondati da una capsula, resistenti al Gram, ha valore diagnostico pratico nella maggior parte dei casi, in cui è già stabilito o fondatamente supposto un processo flogistico del polmone, e l'esame microscopico si fa per accertarne l'etiologia. Bisogna però avvertire che, non essendo rari i portatori di pneumococco, un reperto positivo nello sputo può talora non avere alcun rapporto con l'affezione polmonare in atto, quando questa non sia di natura cruposa; l'agente morbigeno può essere diverso (p. es. lo streptococco, il B. dell'influenza), e trovarsi nell'espettorato insieme con esso anche lo pneumococco.

La diagnosi batterioscopica nella pleurite non riesce sempre: lo scrivente in un caso di pleuropneumonite ricercò invano la presenza dello pneumococco nell'essudato pleurico, mentre l'espettorato appariva una coltura quasi pura di questo germe.

Con maggior frequenza riesce la dimostrazione dello pneumococco nell'essudato peritoneale, in casi di peritonite, e nel liquido cerebrospinale in casi di meningite.

Sempre che la dimostrazione dello pneumococco debba essere fatta in essudati, i preparati vanno allestiti col sedimento dei liquidi sottoposti a centrifugazione.

Isolamento e identificazione.

Dai materiali che contengono lo pneumococco, senz'altri germi, si può isolare direttamente facendo la semina in brodo con siero di sangue o in siero solidificato, o in altro terreno contenente del siero o un liquido equivalente, come agar ascitico glicerinato, agar con siero, agar con sangue.

Se lo pneumococco è mescolato con altri germi, specialmente saprofiti, come accade nello sputo pneumonitico, bisogna sempre ricorrere all'inoculazione sottocutanea del materiale, reso convenientemente omogeneo ed allungato, nel coniglio o anche nel topo. Il coniglio ammala di setticemia pneumococcica, sicchè, facendogli un salasso quando i germi sono passati nel sangue periferico, si ottiene in questo una coltura quasi sempre pura di pneumococco, dalla quale si possono fare quanti trapianti si vuole.

Della purezza occorre in ogni modo assicurarsi facendo colture a piatto in agar con siero o con liquido ascitico, e poi trapiantando le colonie in sostrati nutritivi contenuti in provette.

Una volta isolato, lo pneumococco presenta, come abbiamo detto, nelle colture artificiali i caratteri di uno streptococco a brevi catene.

Per distinguerlo dallo streptococco bisogna tener presente che, mentre questo cresce a 18-20°, lo pneumococco non cresce in generale sotto a 25°; che mentre il primo ha potere emolitico, o, se non l' ha, non dà alcuna modificazione del sangue aggiunto all'agar, lo pneumococco produce quasi costantemente la colorazione speciale di foglia morta; che lo streptococco non coagula il terreno di Hiss (brodo con siero ed inulina), come invece fa lo pneumococco; che gli streptococchi non vengono disciolti dalla bile, lo pneumococco sì; e che finalmente lo pneumococco, inoculato nel topo, ritorna ad essere capsulato e lanceolato, ciò che non fa mai lo streptococco.

Oltre che dallo *Str. pathogenes longus*, lo pneumococco genuino deve essere anche differenziato dai così detti pneumococchi atipici, dei quali si distinguono due gruppi:

1) quelli che per i caratteri morfologici appaiono identici con lo streptococco, ma coagulano il terreno di Hiss;

2) quelli che morfologicamente sono identici allo pneumococco, ma non coagulano il terreno di Hiss.

Più difficile è la diagnosi rispetto allo *Str. mucosus* di Schottmüller, il quale dallo pneumococco distinguesi unicamente per l'aspetto mucoso e la consistenza filante delle colture; così che esso può considerarsi ragionevolmente come una semplice varietà dello pneumococco.

II. — BACILLACEE.

Questa famiglia è rappresentata da elementi a bastoncino, di svariatissime dimensioni, con diverso aggruppamento, dotati o sprovvisti di movimento proprio, aerobi od anaerobi, resistenti o non resistenti al Gram, sporogeni od asporogeni.

Alcuni sono piccolissimi, di forma ellittica breve, col minor diametro di 0.3 0.4 μ, e col maggiore doppio appena del minore: sono perciò chiamati anche *coccobatteri*. Altri sono sottili e lunghi; altri grossi intorno a 1 μ e tozzi, o grossi altrettanto e lunghi. Alcuni hanno le estremità arrotondate, altri quasi tagliate di netto, come fossero tronche.

Si aggruppano in *catene* brevi o lunghe, e volgarmente si chiamano *streptobacilli*; oppure in forma di *palizzata*, cioè l'uno accanto all'altro, parallelamente; o a *stecche di ventaglio*, cioè con le estremità unite da un capo e slontanate dall'altro; o ad X, o ad Y, o in accumuli irregolari.

Secondo Lehmann e Neumann, distinguiamo due generi: *Bacterium*, che comprende tutte le forme asporogene; *Bacillus*, che comprende le forme sporogene. Volgarmente però si usa spesso la parola bacillo in vece di batterio, senza distinzione di significato: si dice, p. es., Bacillo del tifo, Bacillo dell'influenza, pur sapendo che tutti e due appartengono al genere *Bacterium*.

Assegniamo inoltre a questa famiglia alcuni tipi bacillari che hanno affinità cogli Attinomiceti o Streptotrichee, come si vuol dire, e per i quali Lehmann e Neumann hanno stabilito altri due generi: *Mycobacterium*, cui appartiene il B. della tubercolosi, e *Corynbacterium*, cui si ascrive il B. della difterite. Pur riconoscendo la giustezza dei criteri che sorreggono l'istituzione di questi due generi, preferiamo accomunarli insieme con gli asporogeni nell'unico genere *Bacterium*, solo per semplicità di ordinamento della materia, quale ci è imposto dall'indole pratica del libro.

Cominciamo dai batteri asporogeni, riservando alla fine gli sporogeni.

Bacterium influenzae

o *Bacillo dell'influenza, B. di Pfeiffer.*

Durante la pandemia d'influenza che percorse tutta Europa verso il 1892, Pfeiffer scoprì questo piccolissimo germe, e ne asserì l'importanza etiologica; la quale fu posteriormente confermata da altri autori.

Si trova nell'espettorato giallo-verdastro chiaro, viscido, composto di parecchie massettine compatte; si trova pure nel secreto nasale; ed anche nei bronchi e nel tessuto polmonare, in casi di pneumonite lobulare. Raramente è stato osservato anche nel sangue, negli organi, nel cervello.

Caratteri microscopici.

È un bastoncino di piccolissime dimensioni, largo $^1/_3\,\mu$ circa e lungo 2-3 volte più che largo, con estremità arrotondate, immobile, senza ciglia. Nello sputo si presenta anche, specialmente all'inizio della malattia, nell'interno dei leucociti e delle cellule in genere; alcune volte in coppie, raramente in forma di brevissime catenelle.

Si colora debolmente con le comuni soluzioni coloranti, meglio col turchino di Löffler, benissimo con una soluzione di Ziehl diluita 1:10 e fatta agire per 5′ a freddo. Non resta colorato col metodo del Gram.

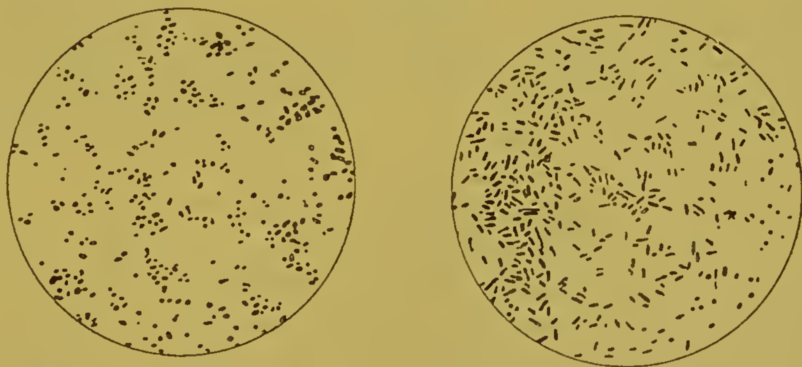


Fig. 511. — B. dell'influenza; a sinistra forme ellittiche in prevalenza, a destra forme di corti bastoncini.

Nelle colture artificiali conserva sostanzialmente gli stessi caratteri, salvo che appare alquanto più grande, e tende ad assumere una forma più netta di bastoncino con estremità arrotondate (v. fig. 511).

Colture.

Il B. dell'influenza cresce soltanto in sostrati con sangue. L'elemento necessario non è il siero nè la parte corpuscolata, ma l'emoglobina, che può essere sostituita da un suo surrogato, p. es. l'ematina, o anche il così detto ematogeno. È strettamente aerobio.

L'ottimo di temperatura è 37°, il massimo 42-43°, il minimo 26-27°.

Colonie su agar con sangue. — Per preparare l'agar con sangue, si possono fare scorrere alcune gocce di sangue umano o di coniglio o di piccione alla superficie di un agar a becco di clarinetto (v. p. 1253); oppure si può mescolare l'agar fluidificato col sangue defibrinato o con una soluzione di emoglobina bene alcalinizzata.

Le colonie che nascono dopo uno o due giorni su questi terreni sono piccolissime, come capocchie di spillo, non mai confluenti, di aspetto ialino, senza struttura, simili a goccioline di rugiada.

Coltura in brodo con sangue o in brodo con siero laccato. — Questi sostrati liquidi devono esser messi in piccola quantità nelle provette, in modo che formino uno strato basso. In essi il B. dell'influenza cresce formando minutissimi fiocchettini biancastri. Lo sviluppo è più rigoglioso nel brodo con siero laccato.

Resistenza in coltura. — La vitalità del B. dell'influenza è minima: per conservarlo in coltura artificiale, bisogna fare trapianti nei terreni speciali ogni 4-5 giorni. Con tutto ciò, dopo alcune generazioni, il germe non si sviluppa più: nelle condizioni più favorevoli si mantiene vitale per qualche mese.

Azione patogena.

Il B. dell'influenza non è patogeno per gli animali d'esperimento: il ratto, la cavia, il piccione, il cane, il gatto sono refrattari. Il topo e talora anche il coniglio soccombono all'inoculazione intraperitoneale di 2-3 colture su agar con sangue; ma la morte avviene per intossicazione, non per una infezione vera e propria: le colture uccise col cloroformio hanno il medesimo effetto. Perez potè riprodurre però nel coniglio raccolte purulente, miositi suppurate, focolai di broncopneumonite.

L'unico animale veramente recettivo all'influenza è la scimmia, nella quale Pfeiffer potè riprodurre una malattia analoga a quella dell'uomo, iniettando colture pure del germe sia nel polmone, sia nella trachea, sia nelle fosse nasali. La malattia sperimentale ha esito in guarigione: in un caso di Pfeiffer l'animale morì, e presentò alla sezione le stesse lesioni polmonari che si osservano nell'uomo.

Importa ricordare in questo capitolo che il B. dell'influenza favorisce la moltiplicazione e l'azione patogena di altri germi, fra cui lo stafilococco, lo streptococco, lo pneumococco, che sono causa di complicazioni o successioni morbose. Ed a sua volta il B. dell'influenza è favorito, anche nello sviluppo in terreni di coltura artificiale, dalla coesistenza dello stafilococco: tanto è vero che esso dà colonie assai più rigogliose del solito se è coltivato insieme con lo stafilococco, oppure sopra una agarcoltura di questo, sterilizzata in autoclave, solidificata in una scatola Petri e poi cosparsa di sangue.

Azione antigena.

Come non è stato possibile di studiare i veleni, che certamente possiede il B. dell'influenza, così non è riuscito neppure di immunizzare gli animali mediante inoculazione di colture vive o morte. Solo Cantoni, iniettando nel coniglio organi ed essudati di animali infettati col B. dell'influenza, od anche con colture uccise, ottenne un siero che avrebbe proprietà antitossiche.

Secondo Kolle e Deliry, nel siero degli animali immunizzati si possono riscontrare delle agglutinine, ma non altre sostanze specifiche, le quali mancano del resto anche nel siero dei convalescenti d'influenza.

Si sa per altro che ad un attacco di questa malattia non segue uno stato immunitario di considerevole durata; anzi talvolta segue il contrario, cioè una recettività maggiore.

Diagnosi batterioscopica.

Se nei preparati fatti con dello sputo caratteristico e colorati col turchino di Löffler e col metodo del Gram, si osservano molti batteri aventi i caratteri morfologici descritti, se essi trovansi inclusi nel protoplasma delle cellule, o almeno ammucchiati in prossimità di nuclei appartenenti a cellule mezzo disfatte, si può affermare la loro identità col B. di Pfeiffer: affermazione che ha, bene inteso, un valore semplicemente pratico, in tempi di epidemia influenzale. Per essere scientificamente sicuri, bisogna fare l'isolamento.

Isolamento e identificazione.

Si sceglie una massettina compatta di sputo, si lava con acqua distillata sterile, e dal centro di essa si preleva un po' di materiale che si stempera in brodo sterile. Questa sospensione si strofina su agar solidificato dentro scatole di Petri, o in provette a becco di clarinetto, avendovi prima disteso qualche goccia di sangue (v. p. 1253). Può adoperarsi anche, secondo Grassberger, agar e sangue defibrinato mescolati nel rapporto 2 : 5 (v. p. 1253); oppure, secondo Huber, agar e soluzione di emoglobina resa fortemente alcalina, ed aggiunta in tal misura da impartire al sostrato una colorazione rosso-chiara.

Bisogna in ogni modo allestire parecchie colture, o meglio serie di colture. Per ogni serie si striscia un'ansata della sospensione dello sputo sopra il terreno solidificato a becco di clarinetto in un tubo, poi dal primo tubo in un altro, e finalmente in un terzo, senza mai riprendere nuovo materiale fra due strisciamenti consecutivi; tale operazione si ripete similmente in altri tubi.

Per identificare il B. dell'influenza, bisogna dallo sputo fare colture, oltre che su agar con sangue, anche su agar ordinario.

Qualsiasi germe, che microscopicamente somigli a quello dell'influenza e che nasca anche su agar ordinario, non è il B. di Pfeiffer.

Elmassian ha studiato un batterio che microscopicamente non si distingue da quello di Pfeiffer: si isola anche su agar ascitico, ed è patogeno per la cavia, nella quale esso, inoculato nel peritoneo, si moltiplica e passa nel sangue, producendo setticemia ed una peritonite rapidamente letale.

Vi sono però altri germi aventi in comune col B. dell'influenza non solo i caratteri microscopici, ma anche la proprietà di crescere solo in terreni con sangue. Si chiamano *batteri pseudoinfluenzali*; essi appaiono soltanto un po' più grossi del B. di Pfeiffer genuino, ma oramai si considerano quasi da tutti come semplici varietà.

B. della pertosse.

Fu scoperto da Bordet e Gengou nel 1906, e la scoperta fu confermata da Soulima, Fraenkel, Arnheim, Seiffert, Klimenko.

I vari germi, cui era stata attribuita da autori diversi importanza etiologica specifica nella pertosse, sono o batteri influenzali o altri della flora delle vie respiratorie superiori, i quali pare abbondino nello sputo dei pazienti soltanto in periodo relativamente avanzato.

Si trova quasi in coltura pura nell'essudato bianchiccio, viscido, tenace, che viene emesso con gli accessi di tosse canina, durante il primo stadio della malattia; via via che questa progredisce, il numero dei germi specifici diminuisce fino a che non sono più rintracciabili, sopra tutto per il sopravvento dei saprofiti. Bisogna ammettere che il B. di Bordet e Gengou resti allora annidato nella mucosa delle vie bronchiali.

Caratteri microscopici.

È un coccobatterio, circa una volta e mezzo o due più grande del B. dell'influenza, immobile, senza ciglia, senza capsula, asporogeno, ben colorabile in genere, non resistente al metodo di Gram.

Nell'espettorato dimostra una caratteristica colorazione bipolare, assai più netta di quella dei bacilli delle setticemie emorragiche, allorchè si colora a freddo per pochi secondi con liquido di Kühne (turchino di metilene carbolico, v. p. 1231) o con turchino di toluidina fenicato (1).

Nelle colture però il germe perde a poco a poco la proprietà della colorazione bipolare.

(1) 5 gr. di turchino di toluidina Grübler si sciolgono a freddo in 100 cmc. di alcool assoluto e 500 cmc. di acqua distillata; si aggiungono poi 500 cmc. di soluzione di fenolo 5 % e si lascia riposare uno o due giorni, dopo di che si filtra.

Colture.

Si sviluppa in alcuni degli ordinari terreni di coltura, neutri o leggermente alcalini, solo quando vien trapiantato da altri sostrati artificiali: l'isolamento non si ottiene che in terreni speciali.

L'ottimo di temperatura è 36-38°, il minimo 18-20°.

È aerobio; ma gradatamente può adattarsi ad un lieve grado di anaerobiosi.

Colonie in agar. — Sono piccolissime, trasparenti, delicate; tali si vedono dopo due giorni.

A poco a poco divengono un po' più grandi, del diametro di 2-4 mm., opache, lattescenti al centro, opalescenti con riflessi verdognoli alla periferia; più tardi appaiono debolmente giallastre. A piccolo ingrandimento appaiono in principio quasi incolore e senza struttura; poi di colore giallo più o meno scuro e finamente granulose. Le colonie profonde sono di colore bruno, ed anch'esse granulose.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar; soltanto sono più piccole, meno granulose, meno brune, meno opalescenti.

Coltura in brodo. — Per le prime generazioni, occorre fare i trapianti in provette contenenti uno strato di brodo alto un centimetro; poi si può fare a meno di tale condizione. Si ha intorbidamento uniforme, con pochissimo sedimento, senza pellicola in superficie e con produzione di sostanza mucoide.

Strisciamento su agar ordinario, o glicerinato 1-5 %, o glicosato 1-2 %. — Patina ristretta, sottile, rilevata, grigiastra, opalescente, leggermente zigrinata, di aspetto più o meno mucoso secondo che rappresenta una generazione meno o più remota dall'isolamento, con margini dentellati.

Infissione in gelatina. — Sottile nastrino continuo, biancastro; in superficie colonia piuttosto espansa, grigiastra, opalescente, leggermente zigrinata. Niente fluidificazione.

Coltura in latte. — Il B. della pertosse rende lentamente alcalino il latte, rischiarandolo ed impartendogli una colorazione giallognola: il fenomeno si compie solo entro uno o due mesi.

Strisciamento su patata. — Patina ristretta, umida, lucente, brunastra.

Colture in terreni speciali. — Nel terreno di Bordet e Gengou (vedi pag. 1254) si hanno delle colonie o delle patine sostanzialmente simili a quelle descritte in agar ordinario, ma per effetto del potere emolitico che possiede il germe, esse vengono circondate da una zona di rischiaramento, e quindi appaiono trasparenti.

Nel siero di Petruschky (v. pag. 1255), nell'acqua peptonata o glicosata o lattosata, nei sostrati di Barsiekòw (v. pag. 1255), il B. della pertosse cresce scarsamente, producendo un leggiero intorbidamento e producendo reazione alcalina.

Vitalità in coltura. — Nelle prime colture la vitalità è relativamente debole; ma nei successivi trapianti, specialmente se si provvede a mantenere un certo grado di umidità, può aumentare. Persiste per un mese nei terreni con sangue, ed anche nel brodo; poco meno in agar; solo 10-14 giorni in gelatina.

Attività biochimiche.

Il B. della pertosse è un produttore di sostanze alcaline: il rischiaramento del latte sembra essere dovuto appunto a queste sostanze, che sciolgono a poco a poco il grasso. Esso produce anche, in quasi tutti i terreni, una sostanza mucoide, in tanto maggior copia quanto più recentemente è stato isolato. Non produce mai indolo. Trascolora in rosso ciliegia cupo il terreno di Rothberger (v. pag. 1255).

Azione patogena.

Le scimmie, i giovani cani e i giovani gatti possono soccombere all'iniezione di colture pure del B. della pertosse, sia che venga fatta sotto cute o nelle vene, o meglio nel peritoneo. Gli animali soccombono dopo un periodo di tempo più o meno breve; talora, dopo aver presentato dei disturbi passeggeri, guariscono.

Sono anche recettivi i topi bianchi e grigi, le cavie, i piccioni; assai meno i conigli, i cani e i gatti adulti, i maiali, le pecore, i cavalli (Klimenko). Bisogna avvertire che secondo Bordet e Gengou gli animali muoiono per intossicazione, non per una vera e propria infezione, poichè il germe non si moltiplica nel loro organismo. Infatti questi autori, inoculando il germe nella camera anteriore dell'occhio del coniglio, videro bensì la cornea farsi bianca ed opaca, la congiuntiva congesta, le ghiandole lacrimali segregare copiosamente; ma l'umor acqueo rimane limpido, mancando ogni accenno di moltiplicazione batterica.

Da tutto ciò appare dunque probabile che il B. della pertosse possieda un'endotossina.

Azione antigena.

Già il fatto che coloro i quali hanno sofferto la pertosse restano immuni ci rende sicuri che il B. della pertosse ha azione antigena. Nel siero di sangue di parecchi malati o convalescenti, diluito 1:10-1:20 o poco più si possono dimostrare agglutinine specifiche; ma queste mancano nel siero di altri malati di pertosse: quindi hanno ben poca importanza pratica. Più costantemente si può dimostrare la presenza di anticorpi specifici fissatori del complemento.

Col B. della pertosse si riesce ad immunizzare degli animali, come il cane, il coniglio, il cavallo. Nel loro siero si possono mettere in evidenza i due tipi di anticorpi nominati: Klimenko ebbe un siero di coniglio agglutinante fino ad 1:100, ed uno di cane fino a 1:600.

Isolamento.

La massima probabilità di riuscita si ha quando si possa seminare l'essudato bianchiccio e tenace dei primi attacchi di tosse, allorchè il germe vi si trova quasi in coltura pura.

Una porzione di tale essudato si lava ben bene in soluzione fisiologica sterilizzata, e quindi si distende a zig-zag alla superficie di una piastra di terreno di Bordet e Gengou (v. p. 1254); le colture si mettono a sviluppare a 37°.

Il terreno è stato modificato da C. Fraenkel, il quale sostituisce all'estratto glicerico di patate l'agar ordinario al 2·5 %; da Seiffert, il quale mescola l'estratto di patate col sangue nel rapporto di 4:1; da Klimenko, il quale ha inalzato a 4 la percentuale di agar da aggiungere all'estratto glicerico, ed ha variato il rapporto fra estratto agarizzato e sangue, mescolandoli nel rapporto di 2:1.

Le colonie del B. della pertosse sono evidenti solo dopo 2-3 giorni: si pescano, e si fanno i trapianti per l'identificazione, che non è difficile a chi ponga mente ai caratteri descritti.

È sempre bene seminare l'essudato, oltre che sul terreno di Bordet e Gengou, anche su agar ordinario.

Nessuno dei germi che nascono in questo può essere il B della pertosse.

Bacterium septicaemiae haemorrhagicae
o *B. delle setticemie emorragiche*.

Comprendiamo sotto questo nome, proposto da Hueppe, differenti varietà che, avendo caratteri morfologici e colturali ed in parte anche potere patogeno identici o simili, vanno ascritte ad una sola specie batterica.

Si trovano nel sangue, negli organi, negli essudati degli animali colpiti.

1. Il prototipo di queste varietà è il *Bact. cholerae gallinarum* (*Bact. avicidum, avisepticum, cuniculicida*), che fu già intravvisto da parecchi autori, fra cui Perroncito e Toussaint, avanti che Pasteur lo isolasse nel 1880. La scoperta di questo germe ha un'importanza capitale nella storia della microbiologia, poichè appunto a questo esemplare batterico si connettono gli studi di Pasteur sull'attenuazione dei virus e sulla trasformazione in vaccini. È causa del colera dei polli, che scoppia in forma epizootica nel pollame, producendo gravi danni economici.

Oltre al B. del colera dei polli, ricordiamo le varietà più importanti.

2. Il *Bact. suisepticum* (*Bact. suicida*), o B. della setticemia dei suini, o peste suina degli Americani (*swine-plague*), o pneumonite infettiva dei Francesi, fu scoperto da Löffler nel 1882.

3. Il *Bact. bubalisepticum* o B. del barbone bufalino, che è causa di epizoozie gravissime fra i giovani bufali, fu scoperto da Oreste ed Armanni nel 1886.

4. Il *Bact. bovisepticum* (*Bact. multocidum*), o B. della pleuro-pneumonite settica dei vitelli.

5. Il B. della diarrea dei vitelli (*entéqué* degli Argentini), il B. di alcuni tipi di pneumonite contagiosa del cavallo, il B. della setticemia dei furetti, il B. della setticemia spontanea dei conigli, e finalmente altri coccobatteri osservati in setticemie di varie specie di volatili e di mammiferi selvatici.

Tutte le su dette varietà di B. delle setticemie emorragiche sogliono chiamarsi anche *Pasteurellae* in onore di Pasteur, che ne scoperse la prima.

Caratteri microscopici.

Sono forme ellittiche, le quali nell'organismo animale hanno il maggiore diametro sempre doppio del minore: hanno dimensioni di 0.3-0.4 × 0.6-0.8 μ; sono immobili, senza ciglia, asporogene, non resistenti al Gram.

La maggior parte degli individui si colorano soltanto ai poli, mentre nel mezzo restano scolorati (colorazione bipolare); le soluzioni coloranti più adatte per rendere evidente questo particolare sono la tionina fenicata o il liquido di Kühne (v. p. 1231).

Per effetto della colorazione bipolare, ogni elemento batterico può sembrare un diplococco. Per lo più i diversi individui sono isolati; talora si riuniscono a due a due.

Nelle colture artificiali il germe tende ad allungarsi, assumendo forma netta di bastoncino, e la maggior parte degli elementi finisce col perdere la proprietà della colorazione bipolare.

Colture.

Sono germi aerobi, con facoltà di anaerobiosi. Il loro ottimo di temperatura è 37-39°, il massimo 41-42°, il minimo 20-25°. Crescono nei comuni terreni di coltura, stentatamente allorchè provengono dall'organismo animale, alquanto più rigogliosamente quando sono già assuefatti ai sostrati di coltura.

Colonie in agar. — Le superficiali sono piuttosto piccole, rotondeggianti, del diametro di 1-2 mm., grigiobiancastre, piane, trasparenti o semitrasparenti, umide. A piccolo ingrandimento appaiono incolore o debolmente giallastre, finamente granulose, con margine regolare.

Le profonde sono ancora più piccole, ed a piccolo ingrandimento appaiono rotonde o ellittiche, di colore giallo bruno, senza caratteri speciali.

Colonie in gelatina. — Somigliano a quelle in agar, salvo che sono più delicate. Non vi è mai fluidificazione.

Coltura in brodo. — Lieve intorbidamento nelle prime 24 ore; dopo il liquido si rischiara, mentre si forma un tenue sedimento biancastro fioccoso. In superficie niente pellicola.

Strisciamento su agar. — Patina continua, ristretta, sottile, trasparente o quasi, grigio-biancastra, lucente, umida. Acqua di condensazione coi caratteri della brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Sottile nastrino continuo nel tratto superiore, nell'inferiore talora composto di coloniette isolate; piccola colonia in superficie; mancanza di fluidificazione.

Coltura in latte. — I coccobatteri delle setticemie emorragiche si moltiplicano nel latte, impartendogli in generale reazione alcalina, quindi lasciandolo fluido. Vi sono però alcune varietà, o meglio alcuni stipiti, che vi producono acidi e lo coagulano.

Strisciamento su patata. — Il più delle volte i coccobatteri non crescono sulla patata, specialmente quando sono stati recentemente isolati dall'organismo; talora vi crescono, ma assai stentatamente; un po' meglio sulla patata alcalinizzata. In questo caso la patina somiglia a quella su agar; solo ha un colore leggermente giallognolo.

Resistenza in coltura. — Nelle colture artificiali i coccobatteri delle setticemie emorragiche restano vitali, talora anche virulenti, per più mesi.

Attività biochimiche.

Per lo più si ha notevole produzione d'indolo e d'idrogeno solforato; da parte del *Bact. bovisepticum* anche fenolo.

Non vi sono dati da ricordare per ciò che riguarda l'azione di questi germi sugli idrati di carbonio.

Azione patogena.

Rispetto al B. del colera dei polli sono recettivi i polli, i piccioni, le oche, le anitre, i tacchini, i volatili di lusso, alcuni passeracei; fra i piccoli mammiferi sopra tutto il coniglio, assai meno il topo, quasi per niente la cavia.

Rispetto al B. della setticemia dei suini è sempre recettivo il coniglio, inoltre il topo bianco e grigio; il pollo, il piccione, la cavia mostrano una recettività incostante.

Rispetto al B. del barbone bufalino è molto recettiva la cavia, ed anche il cavallo, che è quasi refrattario all'infezione da B. del colera

dei polli; sono altresì recettivi il coniglio, i bovini, i suini, gli ovini ed alcuni uccelli.

Da questi dati sulla recettività di varie specie animali rispetto ai coccobatteri che in condizioni naturali sono causa di malattie diverse, appare chiaro che questi germi, pur appartenendo ad una medesima specie, devono essere tenuti distinti come varietà patogene.

La virulenza di questi germi in genere si conserva a lungo nelle colture artificiali su agar: la virulenza del B. del colera dei polli in brodocoltura dopo uno o due mesi è quasi scomparsa, a tal punto che i polli o i conigli inoculati non soccombono che eccezionalmente, presentando spesso soltanto una reazione flogistica locale. Tuttavia, lo stesso germe, mentre è divenuto quasi avirulento per il pollo e per il coniglio, è ancora capace di uccidere il passero: facendo successivi passaggi da passero a passero, gli si può far acquistare di nuovo la prima virulenza.

Iniettando poche gocce di una coltura virulenta di B. del colera dei polli nel muscolo pettorale di un pollo, l'animale muore in 12-24 ore, come fulminato, senza presentare sintomi ben manifesti. Se, essendo il germe poco virulento, il pollo muore soltanto dopo qualche giorno, esso presenta un'andatura incerta, le penne arruffate, la cresta paonazza scura, gran sonnolenza, diarrea mucosa o sanguinolenta; in ultimo si raccoglie a palla, cade in coma e muore dopo qualche scossa convulsiva.

Alla sezione si vede nel punto iniettato un leggiero edema sanguinolento, se l'animale è morto nelle 24 ore; un edema più esteso e più intenso se l'animale è perito dopo qualche giorno; e se l'animale è rimasto in vita parecchi giorni, un'infiltrazione gelatinosa, con tumefazione del muscolo pettorale, che presenta una zona giallastra, talora di aspetto lardaceo, insomma una zona di necrosi. Nel sottocutaneo, nelle sierose, nei polmoni, nel cervello si notano suffusioni sanguigne; l'intestino ha i vasi iniettati e la mucosa di color rosso ortensia, cosparsa di punti emorragici e di ulcerazioni superficiali; la milza è ingrossata e rammollita; il fegato tumefatto, giallastro, friabile; i polmoni presentano infiltrazioni nodulari. Il sangue è nerastro e mal coagulato.

Il coniglio per lo più soccombe tanto rapidamente da non dar tempo al manifestarsi della diarrea: alla sezione si osservano sostanzialmente gli stessi fatti descritti per il pollo; vi è inoltre versamento di liquido sieroso citrino o roseo nel pericardio e nelle pleure.

Il sangue o i tessuti degli animali morti per infezione sperimentale abbondano di germi specifici.

Marchiafava e Celli hanno dimostrato nel coniglio il passaggio del B. del colera dei polli dalla madre al feto.

Gli altri tipi di *Bact. septicaemiae haemorrhagicae* si comportano, per rispetto all'azione patogena, in maniera non dissimile dal B. del colera dei polli, salvo le differenze relative alle specie animali per cui sono patogeni: tutti producono setticemie caratteristiche, con andamento rapido.

Veleni.

I filtrati di brodocolture di B. del colera dei polli e di B. della setticemia dei suini sono tossici per la cavia in dose di 2-3 cmc., purchè le colture abbiano l'età di due mesi e l'inoculazione si faccia per via peritoneale. Si tratta di un'endotossina, la cui azione risulta più evidente allorchè s'inoculano fresche patine cresciute su agar e sterilizzate col cloroformio (Voges).

Una simile endotossina può anche ottenersi dalle colture di B. della setticemia degli animali selvatici.

Macfadyen ha ottenuto col suo metodo dell'aria liquida una endotossina ancora più attiva; Citron e Pütz l'hanno preparata con estratti sierosi od acquosi dei corpi batterici.

Per il B. del colera dei polli e per quello della setticemia dei suini è stata dimostrata anche la produzione di aggressine.

Azione antigena.

I polli che sopravvivono ad una infezione leggiera, sperimentalmente provocata mediante l'inoculazione di colture attenuate, diventano refrattari al colera, come si desume facendo loro iniezioni di colture virulente.

Abbiamo già detto che il germe si attenua nelle colture artificiali; dopo tre settimane circa esso è divenuto avirulento del tutto. L'attenuazione è dovuta, secondo Pasteur, all'azione dell'ossigeno.

Si può dunque con le colture avirulente immunizzare il pollo. Pasteur stabilì il concetto del doppio vaccino; cioè s'inocula il pollo prima con coltura avirulenta, e dopo alcuni giorni con coltura semplicemente attenuata.

A Kitt riuscì di immunizzare il cavallo mediante ripetute inoculazioni sottocutanee: il siero che se ne ricava, nella dose di 2·5 cmc., salva il coniglio e il pollo dall'infezione fatta con tale e tanto virus che gli animali testimoni muoiano in 6-12 ore. Kitt potè anche immunizzare il coniglio, inoculando prima immunsiero di cavallo o di pollo, e dopo 1-3 giorni la coltura del germe.

Vi sono in commercio parecchi sieri contro il colera dei polli: uno di essi porta il nome di « galloserina ».

Anche il B. della setticemia dei suini ha proprietà antigene. Ma non tutti gli stipiti si equivalgono sotto questo aspetto: infatti si ottengono dei sieri specifici che, essendo attivi sopra lo stipite adoperato per la immunizzazione dell'animale sieroproduttore, eventualmente su pochi altri, riescono inefficaci sopra altri stipiti di B. della setticemia. Quindi, allo scopo di ottenere dei sieri specifici la cui azione valga sui vari stipiti che possono essere causa di epizoozie, bisogna inoculare gli

animali con molti stipiti di provenienza diversa, secondo la norma stabilita da Wassermann e Ostertag: alla molteplicità degli antigeni introdotti nell'organismo sieroproduttore corrisponderà una molteplicità di anticorpi immunizzanti nel siero, val quanto dire una maggiore probabilità che questo abbia efficacia nelle diverse epizoozie.

Il siero di Wassermann e Ostertag, il siero di Schreiber o « septicidina », il siero che va col nome commerciale di « suisepsina », si ottengono oramai con procedimenti guidati dal su detto criterio.

Contro il B. del barbone bufalino Oreste, prima solo, poi in collaborazione col Marcone, riuscì ad immunizzare la cavia, il bufalo e il vitello, inoculando in più volte grandi quantità di filtrati e di brodocolture. Blin e Carougeau poterono immunizzare, oltre che il vitello ed il bufalo, anche il cavallo, inoculando prima colture molto attenuate e poi via via sempre più virulente: il siero che si ottiene dal cavallo conferisce al vitello uno stato d'immunità, che può essere notevolmente rinforzato mediante la inoculazione contemporanea di virus. De Giaxa e Di Donna riuscirono ad immunizzare il coniglio, inoculando dosi progressive di agarcolture fresche sospese in soluzione di $NaCl$ 1 % e riscaldate per un'ora a 60°. Il siero degli animali immunizzati, iniettato nella dose di 5-10 cmc., salva i bufalotti e i vitelli da un'infezione sicuramente letale, eseguita con coltura virulenta anche 10 giorni dopo l'iniezione del siero.

Diagnosi batterioscopica. Isolamento e identificazione.

La dimostrazione dei coccobatteri caratteristici nel sangue o negli organi di polli, suini o bufali, malati o morti, è praticamente sufficiente ad asserire che essi germi appartengono rispettivamente al *Bact. cholerae gallinarum*, al *Bact. suisepticum*, al *Bact. bubalisepticum*.

Il reperto batterioscopico positivo permette, nel caso dei polli, di far diagnosi fra colera e peste aviaria, la quale è data da un virus filtrabile; nel caso dei suini, permette di far diagnosi fra setticemia e colera dei suini, il quale è prodotto anch'esso da un virus filtrabile.

L'isolamento riesce facilmente nell'agar ordinario, adoperato in piastre per ottenere colonie isolate e distinte da quelle di altri germi che potrebbero essere commisti nel materiale.

L'identificazione si fa tenendo conto dei caratteri colturali e della squisita azione patogena di tutti i coccobatteri descritti per il coniglio.

Una distinzione fra le diverse varietà di *Bact. septicaemiae haemorrhagicae* non è possibile con sicurezza, quando se ne ignori la provenienza. Si potrebbe pensare all'applicazione diagnostica di reazioni immunitarie; ma anche per questo rispetto vi sono parecchie difficoltà, giacchè, come abbiamo visto, diversi stipiti di una medesima varietà, per esempio del *Bact. suisepticum*, si comportano sotto l'aspetto immunitario in maniera differente.

Bacterium pestis
o *B. della peste bubbonica.*

Fu nel 1894 contemporaneamente scoperto da Yersin e da Kitasato, durante un'epidemia di peste in Cina.

È causa della peste nell'uomo, come anche di epizoozie fra i ratti e le marmotte siberiane (*Arctomys bobac*). Si trova negli organismi infetti: nell'uomo riscontrasi principalmente nei bubboni, nelle pustole ed ulcerazioni cutanee, ed in casi di pneumonite pestosa anche nello sputo: più raramente si trova nel sangue e negli organi interni.

Caratteri microscopici.

Il B. dello peste (v. fig. 112) ha forma ellittica, è largo 0.8-1 μ, e lungo 1, 2-1.5 μ, è asporogeno, immobile o dotato di vivace movimento oscillatorio, sfornito di ciglia. Alcuni autori hanno attribuito uno o due ciglia al B. della peste; ma è un'asserzione fondata su errori d'interpretazione dei preparati, benchè, stando agli studi di A. Meyer e di D. Ellis, non sia da escludersi la possibilità che in condizioni specialissime, quindi praticamente non importanti, si producano delle forme ciliate. Si colora bene con tutti i colori basici d'anilina, non col metodo del Gram.

Nell'organismo il B. della peste si presenta isolato, raramente in coppia, rarissimamente anche in brevi catene, quali sono state viste nell'espettorato in casi di pneumonite pestosa.

Colorato, presenta una caratteristica colorazione bipolare, assai più evidente che non sia nei bacilli delle setticemie emorragiche degli animali. Talora si mostra circondato da una capsula, specialmente quando trovasi nell'essudato peritoneale degli animali sperimentalmente infettati.

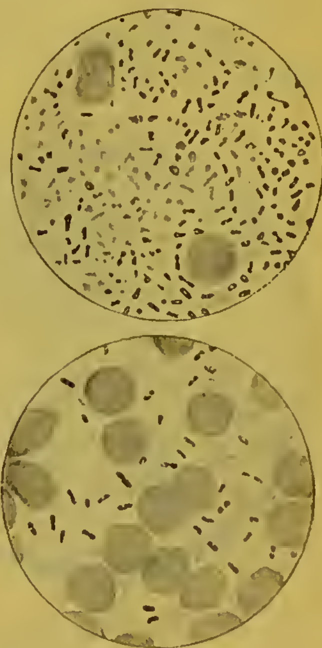


Fig. 112. — B. della peste: in alto dal contenuto di un bubbone, in basso dal sangue.

Nelle colture, specialmente in sostrati liquidi, abbondano gli aggruppamenti a catena o streptobacillari, talvolta assai lunghi; inoltre nelle generazioni alquanto remote da quella d'isolamento la maggior parte degl'individui non ha più la proprietà della colorazione bipolare, e fra essi alcuni sono rotondi e piccoli, altri abbastanza lunghi, con netta forma di bastoncini. Importante è anche la grande variabilità delle forme involutive o degenerative che si possono osservare nelle colture artificiali, un po' invecchiate.

L'alterazione più precoce è il rigonfiamento e la debole colorabilità di alcuni articoli delle catene; ma poi sopravvengono le più stravaganti difformazioni bacillari: piccole e grosse forme clavate, a manubrio, a fuso, a biscotto, a chiodo, a virgola, ad occhiello, e filamenti lunghi, diritti o incurvati, con estremità piriforme. Queste alterazioni si producono già dopo 24 ore nelle colture su agar contenente 3 % di *NaCl* (agar di Hankin). Simili forme involutive o degenerative si possono osservare anche nel cadavere, talora anche nell'organismo vivente, specialmente nell'essudato di bubboni poco avanti che siano fusi.

Colture.

Il B. della peste si coltiva facilmente negli ordinari terreni di coltura neutri o leggermente alcalini. L'ottimo di temperatura sta fra 25° e 30°; il minimo è di 4°.5, il massimo di 43°. 5. È aerobio quasi assoluto; s'è trovato qualche stipite capace di crescere anche anaerobicamente.

Colonie in agar. — Se ne osservano due tipi.

Ad occhio nudo le colonie più caratteristiche, cioè le più piccole, sono in principio delicate, ialine, quasi rugiadose; più tardi prendono un colore grigiobiancastro, e presentano un centro compatto rilevato a calotta ed un'orlatura tenue lobata: a piccolo ingrandimento appaiono granulose, e dimostrano con evidenza la distinzione fra centro opaco, rilevato a calotta, ed orlatura sottile e piana, che lo contorna come una falda (v. figura 513).



Fig. 513.
Colonie di B. della peste in agar.

Le colonie più grandi sono più uniformi, hanno contorno ondulato, sono poco rilevate, piuttosto spesse ed opache, di colore biancastro; a piccolo ingrandimento sono molto granulose, di colore giallastro al centro, incolore e trasparenti alla periferia. L'aspetto loro ad occhio nudo ricorda alcune colonie del *Bact. coli*, al microscopio alcuni tipi di B. difterico: non ha quindi nulla di caratteristico.

Colonie in gelatina. — Ad occhio nudo appaiono piccole, rotonde, sottili, trasparenti, grige, rilevate; a piccolo ingrandimento mostrano contorno regolare o lobato, struttura granulosa, lucentezza giallo-verdastra; talora anche sono circondate da un'orlatura piana, trasparente, lobata, come è stata descritta per le colonie in agar (v. fig. 514). Questi

caratteri si riferiscono alle colonie superficiali, poichè le profonde non hanno alcun che di peculiare. La gelatina non viene mai fluidificata.

Coltura in brodo. — Il brodo in principio è leggermente torbido, o del tutto limpido, con pochissimo sedimento granuloso al fondo; ma poi si va formando alla superficie una pellicola, che prima è sottile e poi diventa sempre più spessa e manda nel liquido delle propaggini filamentose. Se la coltura si fa in palloncini o in matracci, contenenti del brodo su cui galleggino poche goccioline di olio sterile, e se si lasciano stare ferme nel termostato per alcun tempo, la formazione della pellicola assume un aspetto caratteristico, poichè da essa, in corrispondenza delle goccioline, pendono nel liquido dei filamenti o tralci grigiobiancastri, di varia lunghezza, di aspetto grumoso, i quali nello insieme somigliano a un gruppo di ghiacciuoli o di stalattiti.

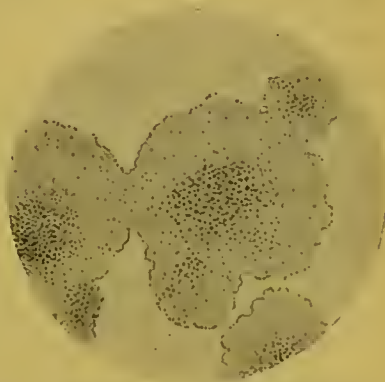


Fig. 514. — B. della peste: colonie in gelatina.

Strisciamento su agar. — Patina per lo più sottile, continua, liscia, grigiobiancastra, umida, alquanto mucosa e filante.

Infisssione in gelatina. — Nastrino tenue, continuo, grigiastro; in superficie una colonia; niente fluidificazione.

Coltura in latte. — Il B. della peste si sviluppa meschinamente nel latte, che non è mai coagulato nè rischiarato.

Strisciamento su patata. — Sviluppo lentissimo, in forma di patina biancastra o biancogiallastra, poco lucente, rilevata, di aspetto granuloso, con margini ben netti.

Vitalità in coltura. — Il B. della peste si conserva bene e per lungo tempo nelle colture artificiali, purchè queste siano protette contro l'essiccamento, tenute all'oscuro e a temperatura di stanza: perde però ben presto la sua virulenza.

Attività biochimiche.

Il B. della peste produce indolo, ma con molta lentezza; sicchè può dimostrarsi soltanto nelle colture vecchie. Secondo Gosio e Biginelli, attacca il lattosio con produzione di acido lattico levogiro. Non produce idrogeno solforato.

Azione patogena.

Sono recettivi all'infezione pestosa in primo luogo i ratti, i topi, le cavie; alquanto meno recettivi i conigli e le scimmie; meno ancora i gatti, i cavalli, i maiali, i pipistrelli; quasi refrattari i cani e i vitelli; refrattari i piccioni e taluni altri uccelli.

La virulenza del B. della peste nelle colture diminuisce, come è stato detto, rapidamente: del resto anche per gli stipiti recentemente isolati essa offre diversissimi gradi. In ogni modo la virulenza può essere esaltata mediante successive inoculazioni in animali recettivi. L'esaltazione si ottiene per la specie animale in cui si fanno i passaggi: così che per aumentare la virulenza rispetto alla cavia occorre fare una serie d'inoculazioni da cavia a cavia; rispetto al topo, bisogna fare lo stesso da topo a topo. Roux esaltò la virulenza del B. pestoso coltivandolo in sacchetti di collodio contenenti brodo e inclusi nel peritoneo delle cavie.

Gli animali d'esperimento recettivi possono essere con successo infettati per via sottocutanea, intravenosa, endoperitoneale, endermica o intramucosa ed anche percutanea o permucosa. Nella cavia, che è l'animale di scelta per saggiare la virulenza del B. pestigeno, facendo l'iniezione sottocutanea, si forma già poche ore dopo un edema circoscritto e si cominciano a tumefare i gangli linfatici vicini. In generale in uno, due o pochissimi giorni l'animale si abbatte sul fianco, e soccombe in preda a crisi convulsive.

Alla sezione si vede che l'edema sottocutaneo è soffuso di sangue o chiazzato di emorragie; i gangli regionali sono tumefatti e circondati da tessuto edematoso infiltrato di sangue; l'addome contiene poco liquido sieroso citrino o roseo, la milza è ingrossata e cosparsa di noduletti miliari grigiastri, gli altri visceri notevolmente congesti, l'omento talora ispessito; la cavità pleurica contiene un po' di liquido simile a quello del peritoneo; i polmoni congesti possono presentare noduli simili a quelli della milza; i gangli linfatici tutti dell'addome e del torace sono più o meno tumefatti. Non di rado i visceri sono qua e là punteggiati di emorragie e di ascessolini minutissimi. I bacilli della peste sono dimostrabili nell'essudato sottocutaneo, nei gangli linfatici, che ne brulicano, nei noduletti splenici e generalmente in tutti gli organi. Le alterazioni anatomiche descritte sono tanto più evidenti quanto più tempo l'animale rimane in vita; anzi, se la morte ritarda fino al 5°-6° giorno ed oltre, si vedono anche noduli assai grossi specialmente nella milza e nel polmone.

Inoculando il virus nel peritoneo, la morte della cavia suole avvenire più presto per setticemia acuta; e nella cavità addominale si trova un liquido viscoso e filante, che contiene moltissimi bacilli, circondati da capsule.

L'infezione nella cavia può farsi anche spalmando il virus sulla cute addominale rasa; nel qual caso si formano delle papulo-vescicole, che poi possono presentare un'ombelicatura simile a quella delle pustole vaiolose, mentre anche s'ingorgano i gangli linfatici regionali.

Nei ratti l'infezione può farsi per la mucosa nasale o congiuntivale integra; ovvero per inalazione di colture nebulizzate, ed allora si ottiene una tipica pneumonite pestosa; oppure per via orale, nel qual

caso però la porta d'ingresso è per lo più rappresentata dalla mucosa orale, specialmente se questa ha lesioni di continuo anche minime.

Veleni.

Le colture fresche uccise col calore hanno in genere una debole azione tossica. Gli estratti di colture vecchie di 2-3 mesi, uccise con la formalina, dànno, se trattati con solfato d'ammonio (Wernicke) o con alcool (Markl) un precipitato la cui tossicità per il topo è rappresentata da frazioni di mgr. Analogamente i filtrati delle brodocolture fresche sono poco o punto tossici; più o meno tossici invece sono quelli di brodocolture vecchie.

Il B. della peste possiede insomma un'endotossina, che Wernicke ottenne trattando con glicerina le colture disseccate, Besredka trattandole con siero di cavallo o triturandole prima con cloruro sodico in sostanza e poi estraendole con acqua.

Lustig e Galeotti, adoperando il metodo descritto a pag. 1302, estrassero dalle patine di agarcolture fresche di B. pestoso una sostanza fosforata, chimicamente riconosciuta come nucleoproteide, la cui tossicità per i ratti, i topi ed i conigli varia da 1:12000 a 1:100000.

Terni e Bandi dimostrarono la proprietà aggressinica ed insieme il potere vaccinante degli essudati peritoneali degli animali infettati di peste, parecchi anni prima che il Bail introducesse il nome di aggressina a proposito de' suoi studi sistematici sull'argomento.

Azione antigena.

Il B. della peste è dotato di potere antigeno.

Il siero di uomini convalescenti o già perfettamente guariti della peste, contiene agglutinine specifiche, attive però soltanto nella diluzione 1:5, raramente anche nelle diluzioni 1:40 e 1:100. Questo fatto non ha però una vera importanza pratica.

Si possono immunizzare degli animali, piccoli e grandi, verso il B. della peste, con vari procedimenti. L'immunizzazione del cavallo è praticamente utile per ottenere dei sieri curativi.

Si possono inoculare in questi animali colture uccise o attenuate col calore, o dosi crescenti ben regolate di colture vive, che nel cavallo provocano, già in quantità piccolissima, forti reazioni. Con questo metodo sono ottenuti i sieri antipestosi dell'Istituto Pasteur di Parigi e dell'Istituto di Tavel a Berna.

Secondo il metodo di Lustig e Galeotti s'immunizzano gli animali col nucleoproteide da loro isolato.

Terni e Bandi immunizzarono buoi e muli con essudato peritoneale di cavie infettate di peste o con succo di bubboni, aggiungendovi il 0.5 % di fenolo.

Il potere protettivo e curativo dei sieri si dimostra evidente allorchè si sperimenta negli animali, a patto che l'inoculazione del siero si faccia in dose sufficiente non oltre le 12-16 ore dopo l'avvenuta infezione. Nell'uomo, in cui si devono inoculare parecchie diecine di cmc. di siero, in più volte, i sieri antipestosi riescono efficaci nei casi lievi e di media gravezza, purchè s'intervenga precocemente.

Sul meccanismo d'azione de' sieri antipestosi è stata ammessa la possibilità che l'efficacia sia dovuta a sostanze antiendotossiche e batteriotrope. Ad un'azione battericida non può pensarsi dopo che Jatta e Maggiora ebbero provato la mancanza di batteriolisine nel siero di animali immunizzati.

Certo non hanno alcuna importanza le agglutinine che i sieri contengono, in quantità per altro poco rilevante, insieme con gli anticorpi fissatori del complemento, già dimostrati nel 1901 da Bordet e Gengou.

Maggiore importanza pratica dei sieri hanno i vaccini antipestosi destinati a produrre e stabilire nell'organismo umano uno stato d'immunità attiva. Sono adoperati il vaccino di Haffkine (brodocolture di 6 settimane riscaldate un'ora a 65°), quello della Commissione tedesca (agarcolture sospese in soluzione fisiologica e riscaldate un'ora a 65°) e quello di Lustig e Galeotti (nucleoproteide), il quale ultimo è preferito, oltre che per la sua efficacia, perchè è meglio conservabile e si può dosare con precisione maggiore, come risulta dalle ricerche comparative di Jatta e Maggiora. Questi autori inoltre hanno sperimentalmente provato il vantaggio della vaccinazione combinata con la sieroprofilassi (sierovaccinazione).

Isolamento e identificazione.

Prelevando, in un malato sospetto, mediante una siringa provvista di un grosso ago-cannula, il succo di un bubbone non suppurato o di un ganglio linfatico, facendone degli strisciamenti su vetrino, tenendoli mezz'ora in alcool o alcool-etere, e poi colorandoli con turchino di metilene carbolico (v. pag. 1231) diluito 1:10, si può stabilire una diagnosi di probabilità solo quando si abbia un reperto caratteristico. Lo stesso dicasi nei casi in cui è richiesto l'esame dello sputo, eventualmente del sangue; come anche quando, alla sezione di un cadavere, debbono essere esaminati anche gli organi interni.

Si può fare altresì una colorazione doppia, immergendo prima i preparati in una soluzione alcoolica di eosina, poi lavandoli in acqua e ricolorandoli con la ricordata soluzione di turchino di metilene (Boccardi). La doppia colorazione fatta con una opportuna modificazione del metodo Romanowsky è utilissima sopra tutto per tingere le sezioni.

Ma, nella diagnosi batteriologica della peste, il reperto microscopico rappresenta il primo passo: bisogna procedere all'isolamento e all'identificazione del germe isolato.

A tale scopo si semina un po' del materiale su piastre d'agar, che si pongono a sviluppare in termostato; ed un altro poco s'inocula sotto cute o nel peritoneo di una o più cavie, possibilmente anche nel topo.

Si notano i caratteri delle colture che nascono sull'agar, e se ne fanno trapianti in brodo e in gelatina; intanto si tengono in osservazione gli animali inoculati, e, se muoiono, il che può accadere dopo 2-3 o pochi più giorni, se ne fa la sezione, per rilevare le alterazioni anatomiche e ricercare la presenza del germe, sia coi preparati microscopici sia con le colture.

Quando al reperto microscopico positivo si aggiunge il criterio dei caratteri colturali e quello dell'azione patogena, la diagnosi batteriologica di peste è assicurata.

Non altrimenti si procede per riconoscere l'infezione pestosa nei cadaveri di animali naturalmente morti in tempi di epidemie, che, come è noto, sogliono essere accompagnate, anzi precedute da epizoozie pestose. Solo che in questo caso, prima di asserire la natura pestosa del germe isolato, cui siansi riconosciuti tutti i precedenti caratteri, bisogna fare la diagnosi differenziale rispetto a batteri simili, patogeni anch'essi per i roditori.

Sono due i più comuni tipi batterici che bisogna differenziare: il *Bact. septicaemiae haemorrhagicae* (v. pag. 1485) e il *Bact. pseudotuberculosis rodentium*. Quanto al primo si tenga presente sopra tutto che il B. pestoso dà in agar e gelatina un certo numero di colonie orlate e nel brodo una caratteristica pellicola; che inoltre esso non è patogeno per il pollo nè per il piccione, i quali invece sono recettivi ai bacilli delle setticemie emorragiche.

Rispetto al secondo germe, si tenga presente che i caratteri colturali non valgono a stabilire sicure differenze: utile è invece la conoscenza che esso non dà in agar di Hankin quelle numerose forme involutive, che sono caratteristiche del *Bact. pestis*; inoltre esso è patogeno per il piccione e per il pollo (De Blasi), mentre non è patogeno per il ratto e per il topo (Galli-Valerio), cioè ha un comportamento contrario a quello del B. pestoso.

Cogliamo l'occasione per dire che col *Bact. pseudotuberculosis rodentium* non hanno che fare altri bacilli della così detta pseudotubercolosi zoogleica, fra i quali ricordiamo il Bacillo opale-agliaceo di Vincenzi, che è mobile, e nelle colture in agar, in gelatina, in siero tramanda un intenso odore di aglio.

Bacterium typhi

o *B. del tifo, B. della febbre tifoide, B. di Eberth o di Eberth-Gaffky.*

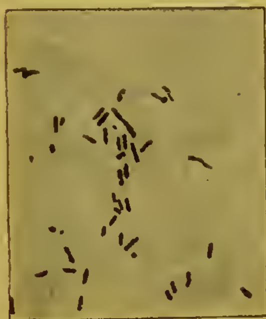
Fu scoperto nel 1880 da Eberth nelle placche di Peyer, nelle ghiandole linfatiche, nella milza dei tifosi; quasi contemporaneamente fu di-

mostrato da Koch nelle sezioni di questi medesimi organi, oltre che del fegato e dei reni; nel 1884 fu isolato in coltura pura da Gaffky.

Il *Bact. typhi* può trovarsi nel sangue ed in qualsiasi organo dei tifosi, viene eliminato con l'urina, con le feci, talora anche con lo sputo; può essere per lunghissimo tempo eliminato anche dalle persone guarite di tifo (emuntori di bacilli), come da alcune persone sane che di tal malattia non soffrirono mai e potranno continuare ad esserne indenni (portatori di bacilli).

Caratteri microscopici.

Il B. del tifo ha tipicamente la forma di un bastoncino diritto, con estremità leggermente arrotondate, in media largo 0.5-0.7 μ, e lungo 2-4 μ. I vari individui si presentano isolati o riuniti a due a due; raramente, ed in condizioni speciali, anche in brevi catenelle. Accanto alle forme di grandezza media si vedono sempre elementi cortissimi, ellittici, ed elementi molto lunghi, sì da meritare il nome di filamenti.


Fig. 515. — B. del tifo.

È mobilissimo, ed è peritrico, avendo una corona di 12-18 ciglia.

La mobilità può essere talvolta leggiera o affatto soppressa, senza che per questo manchino le ciglia; le ciglia possono essere in numero maggiore, fino a 24, o minore fino a 8, e perfino mancare del tutto in qualche stipite mantenuto a lungo in colture artificiali.

Si colora bene con tutte le soluzioni di colori basici d'anilina, non però col metodo del Gram.

Il B. del tifo cresciuto su patate, e colorato specialmente col turchino di metilene, dimostra degli addensamenti protoplasmatici di forma rotondeggiante, ben distinti, per lo più in numero di due, con posizione polare, somiglianti a spore o a granuli polari, che tuttavia non sono spore nè granuli cromotropi, quindi non hanno che fare coi così detti granuli di Babes-Ernst.

Sono stati osservati da H. Buchner, L. Müller, Migula; questi anzi vi annette grande importanza per differenziare morfologicamente il *Bact. typhi* dal *Bact. coli*.

Il B. del tifo è asporogeno: Almquist ha osservato che in certe condizioni può produrre artrospore; ma non è dimostrato che i corpicciuoli da lui osservati abbiano veramente significato di spore.

Colture.

Il B. del tifo si coltiva facilmente e rapidamente in tutti i comuni terreni di coltura. I suoi punti termici cardinali sono: 18°, 37°, 46°. È aerobio, ma può svilupparsi anche in anaerobiosi. Cresce tanto in

sostrati alcalini o neutri, quanto in quelli con reazione leggermente acida.

Colonie in agar. — Le superficiali ad occhio nudo appaiono rotondeggianti, semitrasparenti, grigiobiancastre, splendenti, leggermente rilevate.

A piccolo ingrandimento dimostrano un contorno preciso, un colore giallo, più scuro nel centro e più chiaro verso la periferia, un aspetto granuloso fino o grossolano, e delle linee più o meno evidenti che vanno dal centro al margine con percorso irregolare, a zig-zag. Raramente si vedono colonie moriformi.

Le colonie profonde sono più piccole delle superficiali: ad occhio nudo si mostrano più opache, più compatte, più biancastre; a piccolo ingrandimento appaiono ellittiche o in forma di cote, giallo-brune, senza segni lineari, talora granulose.

Colture in gelatina. — Le superficiali ad occhio nudo sono rotondeggianti, umide, splendenti, talora con riflessi cerulei, semitrasparenti, grigiobiancastre nel centro, grigiochiare verso la periferia, con margine irregolare, dentellato o lobato.

A piccolo ingrandimento (v. fig. 516) si dimostrano incolore o leggermente giallognole, col margine variamente lobato o crenato, con superficie rilevata verso il centro, a guisa di monticello, percorsa da solcature ondulate o spezzate, che digradano dal culmine centrale verso la periferia; oppure da solcature concentriche; o anche dalle une e dalle altre variamente intrecciate. Sono state perciò le colonie paragonate a foglie di fico, a montagne di ghiaccio, a gusci d'ostrica, ad eleganti merletti; le quali similitudini corrispondono più o meno approssimativamente ai vari aspetti delle colonie. Bisogna però avvertire che, se questa è la descrizione classica delle colture del B. del tifo, non mancano delle colonie uniformi, pianeggianti o a calotta, con lobatura e solcature appena accennate o mancanti del tutto, somiglianti perciò ad alcune colonie del *Bact. coli.*

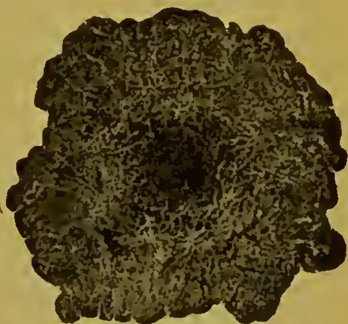


Fig. 516. — Colonia di B. del tifo in gelatina.

Le colonie profonde sono puntiformi, ed a piccolo ingrandimento presentano contorno rotondeggiante o in forma di cote, colore giallo-chiaro, aspetto omogeneo.

La gelatina non è mai fluidificata.

Coltura in brodo. — Intorbidamento uniforme, non molto forte, con discreto sedimento fioccoso biancastro, che si solleva spandendosi per tutto il liquido, allorchè si agita la provetta. Raramente si forma anche una sottilissima pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina estesa, grigiobiancastra, splendente, semiopaca, liscia, con margini regolari.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo, di aspetto granuloso, biancastro.

In superficie una piccola colonietta, raramente una colonia pochissimo espansa, avente i caratteri già descritti.

Coltura in latte. — Il B. del tifo cresce nel latte benissimo, senza coagularlo nè rischiararlo, ma impartendogli una reazione leggermente alcalina.

Strisciamento su patata. — Patina esilissima, talora appena visibile, simile ad una tenue verniciatura.

Sulle patate alcaline però si forma una patina abbastanza spessa, grigiobiancastra o giallognola, a volte umida, a volte arida.

Vitalità in coltura. — Nelle colture il B. del tifo rimane vitale, quindi atto ad essere trapiantato per lungo tempo, fino a due e più mesi.

Attività biochimiche.

Non produce indolo, bensì triptofane; dà idrogeno solforato. Riduce i nitrati in nitriti, e questi trasforma ulteriormente fino alla loro scomparsa, non si sa bene in che modo; scinde il glicosio e la mannite con produzione di acido levolattico; non dà mai gas; non attacca il lattosio; non produce gas in presenza di qualsiasi idrato di carbonio.

Azione patogena.

La riproduzione sperimentale di un quadro simile al tifo umano negli animali da laboratorio è asserita da alcuni, negata da altri. In generale, per uccidere il coniglio o la cavia bisogna inoculare un numero grande di germi, e gli animali muoiono per le sostanze tossiche liberatesi dai germi inoculati, più che per il moltiplicarsi di questi.

Tuttavia non si può negare che in alcuni casi possa ottenersi un'infezione vera e propria, caratterizzata, oltre che dall'intossicazione, anche dalla moltiplicazione dei germi.

Infatti Sanarelli, e Chantemesse e Widal, usando stipiti virulentissimi, riuscirono ad ottenere negli animali un'infezione, nella quale i germi inoculati si moltiplicavano realmente, e producevano la morte per setticemia, con alterazioni anatomiche simili a quelle della malattia nell'uomo. Chantemesse e Widal poterono riprodurre nelle scimmie, anche per ingestione delle colture, un quadro morboso identico a quello della febbre tifoide nell'uomo.

Scordo potè infettare le capre, per via orale o intravenosa, e vedere che esse possono per mesi e mesi eliminare il germe, oltre che con le feci e con l'urina, anche col latte, senza mostrare segni ben manifesti di malattia.

Salvo il caso delle scimmie, all'autopsia degli animali morti per iniezione di B. del tifo, non si riscontra che congestione dei visceri,

con lieve tumefazione splenica, con tumefazione ed arrossamento dei follicoli dell'intestino, talora anche con erosioni dell'epitelio che li riveste.

Veleni.

Filtrando delle brodocolture fresche di B. del tifo, si ottiene un liquido quasi atossico; se sono vecchie di un paio di settimane circa, il filtrato è tossico, però non molto, occorrendo di esso 4-6 cmc. per uccidere una cavia. Ciò fa pensare che il germe non produca esotossine, ma possieda endotossine, che nelle brodocolture si vengono a poco a poco sciogliendo per la morte dei batteri. Tutti gli studi fatti finora per ricercare l'esistenza delle esotossine possono dirsi incerti; alcuni di essi per lo meno ancora contrastati, come quelli di Kraus, di Aronson, di Meyer e Bergell. Per dare ragione di tali dubbi, ricordiamo che Rodet, Lagriffoul e Wahlberg studiarono comparativamente il potere tossico dei filtrati e quello dei rispettivi germi presenti in brodocolture di varia età: essi dimostrarono in tal modo che, mentre nelle colture giovani i corpi batterici sono più tossici dei filtrati, nelle colture vecchie avviene il contrario, la qual cosa starebbe d'accordo con l'ipotesi delle endotossine, contrasterebbe invece con quella delle esotossine.

Comunque sia, lasciando da parte la questione delle esotossine, diremo che le endotossine del B. del tifo sono state ottenute con vari mezzi oltre a quello della filtrazione di brodocolture. Così spremendo al torchio di Buchner le masse batteriche triturate; dissolvendole, secondo Macfayden e Rowland, alla temperatura dell'aria liquida, triturandole e poi sciogliendole con soluzione di potassa a 0.1 %; sospendendole in soluzione di cloruro sodico 0.8 %, tenendole 24-48 ore a 37°, e poi filtrandole, secondo il metodo di Conradi; stemperandole in acqua distillata e scotendole per qualche giorno a temperatura di stanza, secondo Meyer e Bergell; digerendole con tripsina, secondo Mathes e Gothstein; dissolvendole in siero normale di cavallo, secondo Besredka; oppure, secondo lo stesso autore, riscaldando a 60° delle sospensioni in soluzione fisiologica, essiccandole nel vuoto, triturando il residuo con mezza parte di *NaCl* e sciogliendo la polvere con acqua distillata aggiunta a goccia a goccia fino ad ottenere la concentrazione fisiologica: il liquido, riscaldato due ore a 60° e lasciato sedimentare, fornisce l'endotossina. Inoltre, è stato estratto dai bacilli del tifo, col metodo Lustig e Galeotti, un nucleoproteide tossico.

Questi preparati in gran parte riescono letali per il coniglio e per la cavia, solo se inoculati in quantità relativamente grandi; per darne un'idea, rammentiamo che l'endotossina ottenuta col metodo ultimo di Besredka, che è la più attiva, uccide la cavia nella dose di $^1/_4$-$^1/_8$ di cmc., il coniglio nella dose di cmc. 1-1.5.

Azione antigena.

Nell'organismo degli uomini malati o convalescenti di tifo si possono trovare vari anticorpi, con preponderanza dell'uno o dell'altro secondo i casi: sono agglutinine, batteriolisine, batteriotropine, alle quali corrispondono altrettanti antigeni batterici, quali sono gli agglutinogeni, i lisinogeni, i tropinogeni. Inoltre sono state dimostrate quelle sostanze, che sono causa del fenomeno di Bordet e Gengou, e le meiostagmine di Ascoli. Le stesse sostanze si ottengono in varia proporzione fra loro, inoculando negli animali d'esperimento colture vive o morte o prodotti vari di B. del tifo.

Agglutinine. — Questi anticorpi sono tra i più frequenti, e la loro esistenza nel siero è messa a profitto sia per diagnosticare nell'uomo una malattia sospetta d'essere febbre tifoide, sia per diagnosticare con sicurezza un bacillo, che si sospetti essere quello del tifo: la reazione si dice sierodiagnosi o reazione di Widal nel primo caso, batteriodiagnosi serologica o reazione di Durham e Gruber nel secondo caso.

Sierodiagnosi o reazione di Widal. — La reazione si allestisce nel modo che è stato descritto per il *M. melitensis* (v. p. 1461).



Fig. 517. — Agglutinazione del B. del tifo.

La diluzione del siero più conveniente è 1 : 50-1 : 60.

Una diluzione meno forte, per esempio di 1 : 30-1 : 40, può dare il così detto fenomeno paradosso, com'è stato provato dallo scrivente per primo, e confermato poi da Scheller, Nöggerath ed altri: praticamente è importante il fenomeno paradosso perchè può fare disconoscere la positività della reazione.

Nell'osservazione microscopica dell'agglutinazione di questa specie batterica si ha un criterio di più che per il *M. melitensis*: infatti, essendo il B. del tifo mobile, il primo fatto che si può osservare è la paralisi dei movimenti, alla quale succede poi l'aggruppamento degli individui fra loro vicini.

Le agglutinine compaiono nel siero dei tifosi tra la fine della prima ed il principio della seconda settimana, più spesso in questa: talora tardano a comparire fino alla terza settimana ed oltre; qualche rara volta si presentano solo nella convalescenza. Nelle persone guarite di

tifo permangono per alcuni mesi, certe volte per anni: onde la reazione di Widal può servire anche alla diagnosi retrospettiva del tifo.

Il titolo agglutinante del siero dei tifosi è in media 1 : 200-500, di rado inferiore, più volte superiore, fino a 1 : 1000-2000.

Batteriodiagnosi serologica. — Per eseguirla bisogna possedere un siero agglutinante specifico per il B. del tifo. S'immunizzano a tale intento degli animali, principalmente conigli o capretti: il siero che se ne ottiene dopo compiuta l'immunizzazione si titola: il titolo limite deve essere almeno di 1 : 2000, meglio di 1 : 5000-10000, affinchè il siero possa dare più attendibili risultati.

Il bacillo sospetto da diagnosticare si sottopone all'azione del siero agglutinante diluito nel rapporto limite, in un rapporto decuplo, in uno quintuplo, e in uno doppio del limite.

Il bacillo sospetto, già riconosciuto tale per i caratteri morfologici e colturali, si dichiara B. del tifo, quando esso si agglutina almeno nel rapporto quintuplo del limite.

Se si agglutina solo nel rapporto decuplo, bisogna ripetere la prova dopo alcune successive colture di passaggio, o dopo successive inoculazioni nel coniglio o nella cavia, prima di formulare una sicura diagnosi.

Talora degli stipiti recentemente isolati non si agglutinano neppure nel rapporto decuplo, laddove, dopo una serie di passaggi in terreni artificiali o nell'organismo animale, si lasciano agglutinare anche nella diluzione limite o in quella che le è prossima.

Altri anticorpi. — Le batteriolisine e batteriotropine, come abbiamo detto, possono coesistere in varia proporzione fra loro, e trovarsi insieme con le agglutinine (Neufeld e Hüne, Neufeld e Rimpau).

Le sostanze fissatrici del complemento sono state trovate così nel siero dei malati come nel siero degli animali immunizzati.

Vaccinazioni antitifose. — Qualunque siano gli anticorpi attivi nel produrre lo stato d'immunità, è certo che questa si può conferire agli animali inoculando loro dei bacilli morti una o due volte.

Wright, e Pfeiffer e Kolle pensarono di applicare il metodo all'uomo, allo scopo di preservarlo contro l'infezione tifosa. Il vaccino di Wright è costituito da brodocolture uccise col calore a 60° per la durata di 1-2 ore.

Quello di Pfeiffer e Kolle è una sospensione uniforme di agarcolture di 18 ore in soluzione fisiologica, riscaldata a 60° per 1-2 ore: per meglio conservarla, vi si aggiunge il 0.3 % di fenolo. Essa contiene 4 mgr. di patina per cmc.: se ne inocula sotto cute ½ cmc., dopo otto giorni 1 cmc.; dopo altri otto, se si vuole, 1.5-2 cmc. La reazione dell'organismo consiste in tumefazione infiammatoria della regione inoculata, che dura 3 giorni circa, ed in febbre abbastanza forte che cessa di solito nelle 24 ore.

Sclavo adoperò, per immunizzare un buon numero di persone in luoghi molto colpiti dal tifo, un vaccino, preparato a un dipresso secondo il metodo di Neisser e Shiga (v. pag. 1902), con agarcolture di 24 ore, sospese in soluzione fisiologica, riscaldate un'ora a 60°, poi tenute per due giorni a 37°, quindi filtrate per candele Berkefeld: vi aggiungeva infine il 2 % di etere. Tale vaccino è un autolizzato, e dà reazioni meno vivaci degli altri vaccini antitifosi, come ha riconosciuto anche Vincent, uno dei cui recenti vaccini non è altro che quello di Sclavo.

Sieroterapia. — Chantemesse cercò di ottenere un siero antitifoso curativo immunizzando il cavallo. Si coltiva il B. del tifo in brodo di milza bovina, distribuito in basso strato in tanti matracci. Dopo sette giorni si riscalda a 55°, poi si centrifuga: il liquido decantato è tossico.

Nel cavallo si fanno, ad intervalli opportuni, successive inoculazioni sottocutanee di liquido tossico ed intravenose di colture virulente, alternativamente. L'immunizzazione dev'essere assai prolungata: 20 giorni circa dopo l'ultima inoculazione si fa il salasso. L'uso del siero nei tifosi riduce la letalità, secondo l'autore, dal 10-17 % al 3-5 %.

Benchè Chantemesse creda l'azione del suo siero essere di natura antitossica, bisogna però pensare che esso contiene certamente, oltre le antiendotossine, anche batteriolisine e batteriotropine.

Besredka, immunizzando il cavallo per iniezioni intravenose di colture intere, ottenne un siero che è capace di neutralizzare, in dose conveniente, fino a 30 volte la dml. di endotossina tifosa. Kraus, Aronson, e Meyer e Bergell adoprarono per l'immunizzazione del cavallo prodotti solubili del B. tifoso, simili per la termolabilità alle esotossine; i sieri da loro ottenuti sono antitossici e batteriotropi, non batteriolitici.

Il Fränkel ed il Petruschky hanno fatto tentativi di vaccinazione wrightiana nei malati di tifo.

Reazione anafilattica a scopo diagnostico. Chantemesse applicò al tifo l'oftalmoreazione che Calmette aveva introdotto nella pratica diagnostica della tubercolosi. S'instilla nel sacco congiuntivale del malato sospetto una goccia di endotossina tifosa, preparata col metodo di Neisser e Shiga (v. p. 1302); dopo alcune ore, se il malato è un tifoso, si presenta una intensa iperemia della mucosa congiuntivale. La reazione però non è sufficientemente specifica (Kraus).

Isolamento.

Il B. del tifo si può isolare dal sangue, dalle roseole, dall'urina, dalle feci, dal pus di eventuali ascessi; e nel cadavere da quasi ogni organo, principalmente dalla milza, dalle ghiandole linfatiche, dalle pareti intestinali.

Qui ricordiamo soltanto come si isola il germe dalle feci, dall'urina e dal sangue del malato, e dagli organi del cadavere.

Isolamento dalle feci. — Più difficoltoso di tutti è l'isolamento delle feci, in cui il B. del tifo trovasi mescolato con molte altre specie batteriche, quasi tutte saprofite, che sono sempre in numero preponderante; quindi nei comuni terreni di coltura esse prendono sempre il sopravvento in modo che il germe specifico o non si sviluppa, o sviluppandosi dà pochissime colonie difficili ad essere riconosciute e pescate. Riflettendo queste cose, non ci meraviglierà il grandissimo numero di terreni speciali che sono stati successivemente escogitati allo scopo di rimuovere o diminuire la maggior parte degli ostacoli che si frappongono alla proficua ricerca del B. del tifo nelle feci. Si aggiunga subito che, qualunque terreno e metodo si adoperi, occorre una buona propedeutica prima di acquistare quel certo grado di pratica personale, che è in tal caso un importante coefficiente di buon successo: in tal proposito la letteratura ci dà non pochi esempi istruttivi, mostrandoci come uno stesso metodo seguìto da due ricercatori diversi, ugualmente abili per il resto, conduca a risultati ottimi da una parte, poco soddisfacenti all'altra.

Premessi questi avvertimenti, ricordiamo anzi tutto qualcuno degli antichi metodi, che ormai si può dire hanno quasi soltanto un valore storico, e riserviamo all'ultimo la descrizione dei più perfetti metodi di coltura che oggi si conoscono.

Metodo di Remy. Le feci, convenientemente stemperate ed allungate con soluzione fisiologica, si seminano in gelatina di Remy: se ne fanno colture a piatto e le scatole di Petri seminate si tengono 3 giorni a 22°. La gelatina di Remy si ottiene sciogliendo in un litro d'acqua gr. 6 di asparagina, 0.5 di acido ossalico, 0.15 ana di acido lattico e citrico, 5 di fosfato bisodico, 1.25 di solfato potassico, 2 di cloruro sodico, 30 di peptone Witte; vi si mette poi il 15 % di gelatina, e la miscela si tiene 10' in autoclave; ciò fatto, si aggiunge tanta soluzione di acido solforico $N/_3$ che l'acidità risultante nel sostrato corrisponda al 2 % di soda caustica $N/_2$; in ultimo si aggiunge ancora il 0.25 % di solfato di magnesio, ed il tutto si distribuisce in provette e si sterilizza a vapore a 100°.

Le colonie superficiali del B. del tifo cresciute in gelatina Remy (le profonde si trascurano, non essendo caratteristiche) hanno in principio l'aspetto di colonie di muffe, hanno cioè una parte centrale compatta, circondata perifericamente da brevi filamenti radiali ondulati, intrecciati o ramificati; più tardi, crescendo, assumono un aspetto uniforme, uno splendore madreperlaceo e raggiungono un diametro di 5-10 mm. Talune di esse sembrano gocce d'acqua.

S'intende che queste colonie devono essere trapiantate in terreni in provetta, e le colture pure che ne risultano studiate in tutti i loro caratteri prima di poter affermare che esse appartengono veramente al B. del tifo.

Metodo Piorkowsky. Le colture a piatto si fanno in gelatina Piorkowsky, la quale già fluidifica per sè stessa a 22°: quindi le colture allestite si debbono fare sviluppare intorno a 18°. La gelatina Piorkowsky si prepara aggiungendo ad un litro d'urina del peso specifico di 1020, spontaneamente dive-

nuta alcalina, il 0.5 % di peptone ed il 3.3 % di gelatina: il tutto si fa bollire per un'ora poi si filtra e si sterilizza.

Le colonie del B. del tifo hanno in questo terreno un aspetto caratteristico (v. fig. 518): sono formate da un fitto groviglio di filamenti, i quali alla periferia si separano, come tante propaggini più o meno lunghe e ramificate.

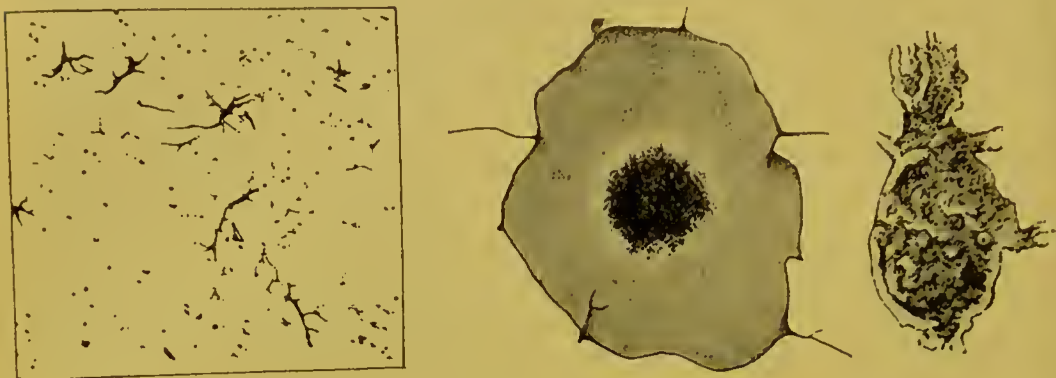


Fig. 518. — Colonie di B. del tifo in gelatina Piorkowsky: a sinistra colonie incipienti, in mezzo e a destra colonie bene sviluppate.

Questo aspetto singolare non basta naturalmente perchè le colonie si possano attribuire senz'altro al B. del tifo: bisogna trapiantarle e studiare tutti i caratteri morfologici, colturali e biologici occorrenti alla sicura identificazione.

Metodo di Elsner. Si fanno colture a piatto in gelatina di patate, preparata secondo la formula di Elsner (v. pag. 1254). Su questo terreno, secondo l'autore, non cresce nessun fluidificante: solo nascerebbe accanto al B. del tifo il *Bact. coli*, e le colonie del primo si distinguerebbero per essere piccole, trasparenti come gocce d'acqua, finamente granulose, quasi incolore, mentre quelle del secondo sono più grandi, giallo-brune, opache.

Le colonie sospette si pescano e si procede alla loro identificazione.

Metodo Drigalski e Conradi. Questo si può dire oggi giorno il metodo principe: e gli altri non pochi venuti dopo sono modificazioni di esso, poichè sono fondati alla fin fine sui medesimi principî.

Il terreno che porta il nome degli autori (v. pag. 1256) non è altro che agar nutritivo, contenente le seguenti sostanze, e per gli scopi rispettivamente indicati.

Per impedire lo sviluppo della maggior parte possibile dei batteri intestinali il terreno contiene il cristalvioletto, una sostanza colorante d'anilina con proprietà asettiche, nella proporzione di 1:100,000.

Per differenziare fra loro le colonie del *Bact. typhi* e quelle del *Bact. coli* si aggiunge del lattosio, il quale, rimanendo inattaccato dal primo, è scisso rapidamente dal secondo con produzione di acidi: l'aggiunta di una certa quantità di soluzione di laccamuffa serve appunto per rendere possibile, con l'indicazione dell'arrossamento, l'immediata distinzione delle colonie del *Bact. coli*.

Affinchè gli acidi prodotti dal *Bact. coli* non si diffondano troppo oltre il confine delle sue colonie, riuscendo così a mascherare col rosso le vicine

colonie di *Bact. typhi*, il sostrato nutritivo è preparato col 3 % di agar, in vece dell'ordinaria proporzione di 1.5 %.

Questo terreno si versa e si lascia solidificare dentro scatole di Petri. Le feci da seminare vengono prima convenientemente diluite, per lo più nel rapporto 1:10, con soluzione fisiologica: se ne scelgono a tal uopo parecchie particelle in diversi punti della massa fecale, oppure questa si rimescola prima, quando è possibile; si riuniscono le particelle in un matraccetto e vi si aggiunge il diluente a poco a poco, stemperando ed agitando ogni volta, fino a raggiungere il volume stabilito.

Si tengono pronte 3 serie di 5 scatole ciascuna. Si bagna nel liquido da seminare la branca breve della bacchetta Drigalski (un bastoncino di vetro piegato ad angolo retto, con una branca breve ed una lunga, che fa da manico), e poggiatala tutta sulla superficie di una piastra da un lato, si striscia in modo eguale verso il lato opposto; poi, senza sterilizzarla, si striscia sul secondo agar della prima serie; poi sul terzo, e così via fino alla 5ª piastra. Terminata la prima serie, s'intinge di nuovo la bacchetta nella sospensione fecale, prima ben rimescolata, e nella maniera detta per la prima serie, si allestisce la seconda; così poi la terza, e le altre, se altre conviene di farne, come si raccomanda per le feci dei sospetti portatori.

Le scatole Petri vanno poste a 37°, scoperchiate; dopo 12-14 ore, non oltre, si ritirano. In genere le prime piastre di ciascuna serie sono poco utilizzabili, perchè contengono troppe colonie: la ricerca perciò si fa in quelle colture dove le singole colonie son ben separate, possibilmente lontane fra loro. Le colonie del *Bact. coli* sono contrassegnate dall'arrossamento, quelle del *Bact. typhi* appaiono turchine. Però non tutte le colonie turchine sono di *Bact. typhi* : prescindendo da altri patogeni specifici, come i bacilli paratifosi e dissenterici, altri germi possono crescere sul terreno, dando colonie turchine: tali sono alcuni streptococchi, i bacilli mucosi, i fluorescenti, i protei, talora anche varietà di *Bact. coli* che ritardano la loro azione sul lattosio, o che non la manifestano per nulla. Un occhio bene esercitato può scorgere quali fra le colonie turchine hanno maggior probabilità di appartenere al B. del tifo. Esse hanno per lo più un diametro minore di quelle del *Bact. coli*, sono sottili, delicate, trasparenti, piane, umide. Si pescano parecchie delle colonie giudicate sospette, per farne delle colture in provette e procedere all'identificazione.

Invece di seminare direttamente la sospensione delle feci in terreno Drigalski, può riuscire utile l'arricchimento preliminare secondo il metodo di Roth, modificato da Hoffmann e Ficker. Il vantaggio di tale procedimento è stato asserito da parecchi, ed ultimamente riconosciuto da Mannelli con esperienze comparative eseguite su più metodi.

Circa un grammo di feci si sospende uniformemente in 10 cmc. di un liquido nutritivo costituito di acqua che contenga del nutrosio 1 %, del cristalvioletto nella proporzione 1:100,000 e della caffeina pura cristallizzata nel rapporto 1:200. È bene allestire tre di tali tubi. Si tengono in termostato 15-20 ore; indi si semina mezzo cmc. del contenuto di ciascuna provetta sopra una piastra Drigalski, e da questo si fanno i passaggi successivi in altre quattro piastre, come già è stato detto.

Metodo di Endo. Si procede come col metodo di Drigalski e Conradi, salvo che si adopera l'agar di Endo (v. pag. 1256).

La fucsina che questo sostrato contiene serve da asettico ed insieme da indicatore: essa non si riconosce nel terreno sterile, perchè ridotta dal coesistente solfito sodico. Il *Bact. coli*, scindendo il lattosio, produce acidi, e questi si legano con la base colorante incolora, formando un nuovo sale, quindi ripristinando il color rosso caratteristico della fucsina. Il *Bact. typhi*, non producendo acidi, lascia intatta la base scolorata. Perciò le colonie del primo appaiono rosse, mentre quelle del secondo sono incolore.

Le stesse avvertenze fatte per il metodo Drigalski e Conradi valgono anche per quello di Endo.

Metodo di Lentz e Tietz. È stata già indicata la composizione tipica dello agar lattosato con verde di malachite (v. p. 1257), che si adopera appunto in questo metodo. Bisogna però avvertire che per meglio riuscire allo scopo l'aggiunta del colore, secondo Lentz e Tietz, non va fatta nella quantità definita ivi ricordata; essi hanno visto che la proporzione che a un tempo sia l'ottima per lo sviluppo del B. del tifo e la più sfavorevole per il *Bact. coli*, è variabile secondo le diverse provviste di terreno che si tengono in serbo, anche quando si ponga ogni scrupolo nel preparare il terreno sempre con le stesse regole.

Si abbia dunque già pronta una certa quantità del sostrato indicato a pag. 1257, cui però non siasi ancora aggiunto il colore. Di questo allora si fanno soluzioni diverse nei rapporti 1:300, 1:350, 1:400, 1:500, 1:600, eventualmente anche altre più diluite; in altrettante grosse provette si versa il sostrato liquefatto in quantità di 20 cmc. per ciascuna, in ognuna si aggiunge 0.2 cmc. delle rispettive soluzioni di verde di malachite: il colore trovasi così sciolto nelle diverse provette in proporzioni comprese fra 1:30,000 e 1:60,000.

Il contenuto di ciascuna provetta si versa in una scatola di Petri; ed appena divenuto ben solido, viene seminato in una metà con uno stipite di *Bact. coli*, nell'altra con uno di *Bact. typhi* di recente isolamento. Si pongono le piastre, capovolte, a 37°: dopo 24 ore si osservano, e si nota in quale di esse il B. del tifo è cresciuto meglio ed il *Bact. coli* peggio. Così è determinata la proporzione ottima in cui il colore dev'essere sciolto nell'agar preparato: ogni volta che bisogna isolare il B. del tifo dalle feci, alla quantità d'agar necessaria si aggiunga quella data quantità di soluzione di verde di malachite.

In questo terreno si seminano le feci come è stato detto per il metodo Drigalski e Conradi. Dopo 24 ore le colonie di B. del tifo appaiono piccole, chiare, piane, trasparenti.

Metodo misto. Il terreno di Lentz e Tietz, anche quando non dà luogo allo sviluppo di probabili colonie di B. del tifo, può essere ancora utilizzato come sostrato d'arricchimento; in tal caso l'isolamento vero e proprio è riservato, in secondo tempo, al terreno Drigalski e Conradi.

Si ha così un metodo misto, che si attua nel seguente modo.

Si seminano due grosse gocce della sospensione fecale su due piastre di agar con verde di malachite, e vi si spandono con ogni cura mediante la bacchetta di vetro, inclinando in varie direzioni le scatole Petri. Le due colture vengono tenute 16-20 ore a 37°; dopo di che, se non sono nate colonie sospette, si versano su ciascuna piastra 8-10 cmc. di soluzione fisiolo-

gica sterile. Si lasciano stare le due piastre per due minuti, poi si muovono parecchie volte, inclinandole in varie direzioni; con ciò si ottiene che il liquido, sciacquando ripetutamente, asporti le colonie eventualmente presenti di *Bact. typhi*, mentre le più spesse colonie di *Bact. coli* restano aderenti al terreno, o, se mai ne vengono staccate, rimangono unite come piccolissimi granellini. Ciò fatto, s'inclina la scatola e si lascia riposare mezzo minuto, per dar tempo alle colonie di *Bact. coli*, che possono essere state asportate, di andare al fondo.

Indi una, due o tre grosse ansate della uniforme sospensione batterica ottenuta si seminano sopra una piastra Drigalski e Conradi, vi si spandono con una bacchetta di vetro o con una spatola, e da essa si allestiscono in serie altre due o tre piastre. Le quali vanno messe a 37°, ed osservate come è stato detto per il metodo Drigalski e Conradi.

Isolamento dall'urina. — È bene, potendo, raccogliere l'urina sterilmente in matracci o palloncini sterilizzati. Basta seminare 0.5-1 cmc. di urina, senza bisogno di prima centrifugarla, in una prima piastra di agar Drigalsky, e far poi il passaggio per mezzo della bacchetta, come è stato detto per l'esame delle feci, successivamente in altre 3-4 piastre dello stesso terreno. L'osservazione delle piastre va fatta dopo averle tenute 12-14 ore a 37°.

Isolamento dal sangue. — L'isolamento dal sangue è stato molto perfezionato in questi ultimi anni. Ricorderemo anzitutto il metodo meno recente, che è quello di Castellani, e col quale già riuscì a questo, a Schottmüller e ad altri di isolare parecchie volte il germe dal sangue periferico; poi riportiamo qualcuno dei nuovi metodi praticamente utili. Il B. del tifo si può isolare dal sangue in prima settimana in circa i $^3/_4$ dei casi, in seconda settimana in circa la metà dei casi: nelle successive settimane la frequenza dei reperti positivi è assai minore.

Metodo Castellani. — Si mescolano XX-XL gocce di sangue, cavato da una vena del braccio, con 200 cmc. di brodo contenuto in un matraccio di Erlenmeyer: si pone questo a 37°, e dopo 24-48 ore si osserva se è intorbidato o pur no; nel primo caso, si può per l'identificazione procedere senz'altro alle prove d'agglutinazione, facendo uso di un siero specifico ottenuto dal coniglio. Per lo studio completo del germe nato si fanno trapianti in provette, facendo precedere magari una semina in agar a piatto, quando vi fosse dubbio della coesistenza di qualche altro germe insieme con quello del tifo: la qual cosa del resto non accade mai, se si fa il prelevamento del sangue con le buone regole dell'asepsi.

Metodo Conradi. — Si mescola cmc. 0.5-1 di sangue col doppio volume di bile bovina sterilizzata: la miscela si tiene 14-16 ore a 37°, indi se ne semina ½ cmc. in una piastra di terreno Drigalsky: questa si mette per 12-14 ore in termostato, poi si osserva, e si isolano per ogni ulteriore operazione le colonie eventualmente nate. Kayser consiglia di mescolare 2.5 cmc. di sangue con 5 di bile. Il vantaggio di prelevare molto sangue è stato riconosciuto poi anche da Conradi, il quale ha per giunta proposto di aggiungere alla bile peptone e glicerina ana al 10 %. De Blasi ha ottenuto risultati non inferiori adoprando semplice bile, secondo la prima indicazione di Conradi,

e precisamente bile di bufalo, e mescolando 5 cmc. di sangue con 8 cmc. di bile.

Meyerstein ha visto che la proprietà dissolvente della bile è dovuta ai sali biliari, della cui soluzione concentrata II-III gocce si possono aggiungere a 2-3 cmc. di sangue.

Metodo Rosen-Runge. — Si adopera dell'agar comune contenente 1 % di glicocolato sodico: a 10 cmc. di agar fluidificato e intepidito si aggiungono 2 cmc. di sangue, e la miscela si versa in una scatola Petri.

Metodo Fornet. — Fornet ha pensato di utilizzare per l'isolamento del B. del tifo il coaguletto che si forma nei tubetti capillari contenenti il sangue raccolto per la sierodiagnosi: per questa reazione si adopera naturalmente il siero, mentre il coaguletto si mette in bile, e si procede poi come per il metodo Conradi.

Questo metodo riesce parecchie volte: ma è un metodo dirò così d'occasione, non di scelta; poichè i bacilli del tifo nel sangue non sono in generale numerosi, quindi per accrescere la probabilità della riuscita occorre sempre adoperare molto sangue.

Isolamento dagli organi. — Faremo l'esempio della milza. Si cauterizza la superficie capsulare dell'organo, o la superficie di taglio, se già è stato spaccato, si trapassa l'escara con un robusto uncino di platino, si strappa un frammento di polpa, e questo si semina a zig-zag alla superficie dell'agar Drigalski solidificato in una scatola Petri. Può anche triturarsi prima il frammento strappato, in mortaio sterilizzato, aggiungendovi qualche goccia di acqua distillata sterile: ma è manovra nel più dei casi superflua.

Identificazione.

Per identificare il *Bact. typhi* non bisogna trascurare nessuno dei criteri microscopici e colturali descritti; nè omettere mai la prova dell'agglutinabilità in presenza di un siero specifico di alto titolo agglutinante.

Solo quando sono concordi i risultati di tutte le prove fatte si può asserire che un dato germe è veramente il B. di Eberth.

Trascurando l'una o l'altra delle dette prove, si può confondere il *Bact. typhi* con molti batteri più o meno affini. Dopo che avremo descritto i principali patogeni fra questi, raccoglieremo in una tabella sinottica i caratteri principalissimi da aver presenti nelle diagnosi differenziali.

Qui però dobbiamo subito ricordare un germe che nello specchietto non figura, e che è similissimo al B. del tifo: il *Bact. alcaligenes* di Petruschky (*Bacillus faecalis alcaligenes*). I caratteri per i quali questo si differenzia sono: patina giallognola rigogliosa sulla patata, che col tempo imbrunisce; produzione di alcali nel latte con lieve rischiaramento ed ingiallimento dopo alcuni giorni; nessuna azione fermentativa sul glicosio; patina non perfettamente liscia, ma quasi granita o leggermente

zigrinata, su agar; non di rado pellicola alla superficie della brodocoltura. Secondo Berghaus è monociliato; ma non può questa considerarsi come proprietà costante, perchè Petruschky aveva già indicato il suo germe come peritrico. Trincas ha isolato il germe da campioni di formaggio, la cui ingestione aveva prodotto nell'uomo una grave tossinfezione, ed ha riconosciuto che, coltivato nel latte ed introdotto per via gastrica nel cane, dà fenomeni morbosi simili a quelli osservati nell'uomo.

Bacilli paratifosi.

Sotto questo nome comprendiamo tutti quei germi che, avendo caratteri morfologici e colturali similissimi a quelli del B. del tifo, se ne differenziano per alcune proprietà biochimiche, oltre che per il loro potere antigeno.

Sono molti e diversi gli aggruppamenti che di questi batteri hanno proposto di fare i diversi autori. Noi li distingueremo in tre gruppi.

1) Bacilli del tipo *Bact. paratyphi* A, che è l'unico rappresentante.

2) Bacilli del tipo *Bact. paratyphi* B, cui appartengono, oltre questa specie, il *Bact. suipestifer*, il *Bact. psittacosis*, il *Bact. typhi murium*, e pochi altri, fra i quali il noto B. dell'epidemia di Aertryk studiato da de Nobele e quello della piccola epidemia del 1906 in Bologna (Tiberti, Gardenghi).

3) Bacilli del tipo *Bact. enteritidis* Gärtner: vi si comprendono quelli che furono causa di tossinfezioni epidemiche da carne a Morseele e Gent, a Rumfleth e Haustedt, a Bruges, a Bruxelles, a Villebroek, oltre al bacillo dei ratti di Danysz e simili.

Il *Bact. paratyphi* A fu trovato da Schottmüller nel 1900, ma così denominato da Brion e Kaiser nel 1902.

Il *Bact. suipestifer* fu trovato da Salmon nel 1886; il *Bact. paratyphi* B fu trovato da Achard e Bensaude nel 1896, e così denominato da Brion e Kayser nel 1902.

Il *Bact. enteritidis* fu trovato da Gärtner nel 1888.

Ricordiamo ancora che Carducci isolò nel 1905, da un caso di ittero, un germe che dal B. paratifoso B distinguesi unicamente perchè non attacca la dulcite: fu chiamato *Bact. paratyphi* C.

Facciamo di tutti questi germi, che hanno moltissimi caratteri comuni, una descrizione complessiva, notando a suo luogo le differenze che hanno importanza diagnostica.

Caratteri microscopici.

Sono bastoncini larghi 0.5-0.7 μ e lunghi 2-4 μ, con estremità arrotondate, tutti dotati di movimento di traslazione, peritrichi, con 8-12 ciglia in media, asporogeni, facilmente colorabili, non resistenti al Gram.

Il *Bact. paratyphi* A è rappresentato da individui piuttosto snelli, più somiglianti perciò al *Bact. typhi*; gli altri due tipi sono rappresentati da forme pinttosto tozze, che quindi meglio ricordano il *Bact. coli.*

Colture.

Si coltivano tutti facilmente negli ordinari terreni di coltura; sono aerobi, con facoltà di anaerobiosi; hanno l'ottimo di temperatura a 37°, potendo svilupparsi anche a 15-16° ed a 44-45°.

Colonie in agar e in gelatina. — Quelle del *Bact. paratyphi* A sono delicate, semitrasparenti, con margini ondulati e superficie solcata, somigliano quindi a quelle del *Bact. typhi*; le colonie degli altri due tipi hanno per lo più caratteri identici o simili a quelli del *Bact. coli.*

Colture in brodo. — Le brodocolture di questi germi sono torbide, meno di tutte quella del *Bact. paratyphi* A; raramente si forma una tenue pellicola in superficie; sempre vi è un discreto sedimento biancastro fioccoso al fondo.

Strisciamenti su agar. — Patine continue, uniformi, lisce, umide, grige o grigio-biancastre, con margini regolari; quelle del *Bact. paratyphi* A sono più sottili delle altre. Acqua di condensazione coi caratteri delle rispettive brodocolture.

Infissioni in gelatina. — Nastrini continui, grigiastri o grigiobiancastri; colonie in superficie coi caratteri di quelle che nascono nelle colture a piatto, di solito però più espanse; mancanza di fluidificazione.

Colture in latte. — Si sviluppano tutti nel latte: il *Bact. paratyphi* A non lo altera, solo gl'impartisce dopo alcuni giorni una debole reazione alcalina; il *Bact. paratyphi* B ed il *Bact. enteriditis* lo alcalinizzano fortemente, e finiscono col rischiararlo dopo due settimane circa. Inoltre le colture in latte degli ultimi due germi nominati, sottoposte dopo 24 ore alla prova di Biffi (v. p 1276), coagulano, ciò che non accade per il *Bact. paratyphi* A.

Strisciamenti su patate. — Si sviluppano sulle patate tutti e tre i tipi, dando patine evidenti: quella del tipo A è molto più sottile di quella degli altri tipi, essendo però sempre bene evidente, assai più che quella del *Bact. typhi.*

Le patine degli altri due tipi sono in generale rigogliose quanto quella del *Bact. coli*, e le somigliano anche per gli altri caratteri.

Attività biochimiche.

Questi germi producono più o meno idrogeno solforato, non indolo nè fenolo: solo qualche stipite di *Bact. enteriditis* può dare debolissime quantità delle ultime due sostanze (Gardenghi). Tutti i Bb. paratifosi producono triptofane (Sampietro).

Scindono il glicosio, il maltosio, il galattosio, il levulosio e la mannite con produzione di acidi e di gas; la dulcite e l'arabinosio con sola produzione di acidi.

Nessuno attacca il saccarosio, il lattosio e la glicerina.

Nel terreno di Rothberger semplice il tipo A produce ingiallimento e lieve fluorescenza; gli altri dànno fluorescenza più o meno evidente. Nello stesso terreno, lattosato secondo l'indicazione di Segale (v. p. 1256), il tipo A rischiara il terreno e produce una fluorescenza tardiva ed incerta, mentre gli altri ingialliscono il terreno e dànno una fluorescenza rapida e netta.

Bisogna avvertire che le indicazioni dei vari autori sulle attività biochimiche dei vari tipi di bacilli paratifosi non sono tutte concordi con quelle qui riferite: per esempio, Schmidt ha trovato che molti stipiti di *Bact. suipestifer* producono indolo, mentre il *Bact. paratyphi* B non ne produce mai; Gardenghi ha visto che il *Bact. enteritidis*, il *Bact. paratyphi* E e il *Bact. suipestifer* non attaccano la glicerina, la quale secondo altri sarebbe attaccata da qualche stipite, e che salvo, il primo, non attaccano neppure le mannite; e via dicendo.

Bene accertato è che i bacilli paratifosi scindono il glicosio con produzione di acidi e gas, ciò che li distingue dal *Bact. typhi*, e che non attaccano il lattosio, ciò che li distingue dal *Bact. coli*. Fra *Bact. paratyphi* A e *B. paratyphi* B è sempre possibile fare la diagnosi con mezzi colturali, p. es. coltivandoli in latte e nel terreno Rothberger lattosato.

Fra i tipi per cui una differenziazione sicura non si può fare coi soli criteri colturali, si ricorre al criterio immunitario, di cui sarà detto più oltre.

Azione patogena.

I bacilli paratifosi sono patogeni per la cavia, il coniglio, il ratto, il topo.

Il *Bact. paratyphi* A si comporta come il *Bact. typhi;* gli altri invece hanno una forte azione patogena sopra tutto per i ratti e per i topi: basti ricordare che il B. di Danysz è adoperato per distruggere questi animali nei luoghi che ne sono infestati in grado impressionante per l'economia rurale.

Per qualunque via s'inoculino, producono un'infezione letale, sicchè gli animali muoiono in 12-24-48 ore, con il sangue e gli organi pieni di germi. Le alterazioni anatomiche somigliano a quelle che saranno descritte per l'infezione sperimentale da *Bact. coli*.

Veleni.

Lasciando da parte il *Bact. paratyphi* A, per il quale si può ripetere in generale quello che è stato detto per il *Bact. typhi*, possiamo dire che i bacilli paratifosi hanno spiccate proprietà tossiche per gli animali di

esperimento, il che fa riscontro con quanto è stato osservato nelle infezioni da essi prodotte nell'uomo.

Tanto i filtrati delle brodocolture invecchiate di una o due settimane, quanto gli autolizzati delle agarcolture o i corpi batterici semplicemente uccisi con toluolo o fenolo o tricresolo, inoculati in frazioni di cmc. o di gr. nelle cavie o nei topi, ne producono le morte per lo più dentro le 24 ore. Se, per la scarsezza della dose inoculata, gli animali muoiono dopo alcuni giorni, presentano paralisi del treno posteriore, ed alla sezione il fegato mostra dei focolai necrotici. I liquidi tossici non perdono ma solo diminuiscono il loro potere, dopo che sono riscaldati per alcuni minuti a 100°.

Dalle esperienze fatte in diverse occasioni da autori diversi risulta che i germi di questo gruppo possiedono un'endotossina; ma che accanto ad essa vi sono altri veleni, non specifici, cui probabilmente devesi la resistenza dei liquidi tossici alla temperatura di 100°.

Azione antigena.

Nel siero dei malati di paratifo si riscontrano gli stessi tipi di anticorpi che abbiamo conosciuto per il B. del tifo, cioè agglutinine, batteriolisine e batteriotropine: sui loro rapporti si può egualmente ripetere la medesima cosa.

La presenza delle agglutinine è utilizzata per la diagnosi serologica della malattia; ma, siccome sono ben altro che rare le agglutinazioni di gruppo, bisogna, allorchè queste si presentano, ricorrere alla prova di Castellani (v. pag. 1418).

Gli animali d'esperimento possono essere immunizzati rispetto ai vari germi del gruppo: se ne ottengono dei sieri agglutinanti il cui titolo raggiunge facilmente valori di 1:5000-10,000. Appunto a tali sieri specifici di alto valore si ricorre per differenziare alcuni tipi e sottotipi appartenenti ai Bacilli paratifosi, quando i caratteri colturali non siano sufficienti a stabilire nette differenze. I germi del tipo B e quelli del tipo Gärtner si differenziano fra loro principalmente per mezzo dell'agglutinazione e di altre reazioni immunitarie.

Isolamento e identificazione.

I bacilli paratifosi, avendo tutti comune la proprietà di non attaccare il lattosio, vengono isolati sui terreni e coi metodi stessi che servono per il B. del tifo.

Una volta isolati, si procede alla loro identificazione, mediante i caratteri colturali ed il criterio immunitario, che non dev'essere mai trascurato.

Per la diagnosi differenziale rispetto al B. del tifo, al *Bact. coli* e ad altri germi di minore importanza, che in questo manuale non sono trattati a parte, vedi la tavola sinottica a pag. 1525.

Bacterium coli commune

o *Colibacillo.*

Fu descritto la prima volta da Escherich, che lo isolò dall'intestino umano nel 1885.

Si trova in condizioni normali nel contenuto intestinale dell'uomo e di parecchie specie animali.

Al *Bact. coli* si sono attribuite e si attribuiscono alcune infezioni febbrili tifosimili. Per ciò che concerne la importanza di una sua varietà nella dissenteria. v. il capitolo seguente.

Caratteri microscopici.

Bastoncini diritti, con estremità arrotondate, delle dimensioni di $0.5\text{-}0.7 \times 2\text{-}4\ \mu$, asporogeni, mobili, con 6-8 ciglia, ben colorabili con i colori basici d'anilina, non però col metodo di Gram. Non di rado sono riuniti a due a due (v. fig. 519); talora in brevi catenelle, ed anche in corti filamenti. Nelle vecchie colture su patata dimostrano i poli più intensamente colorabili del centro.



Fig. 519. — *Bact. coli.*

Colture.

Cresce bene su tutti i terreni di coltura, in aerobiosi ed in anaerobiosi; l'ottimo di temperatura è 37°, il minimo 10-12°, il massimo 44-45°. Si sviluppa, oltre che nei sostrati neutri o alcalini, anche negli acidi.

Colonie in agar. — Le superficiali sono rotonde, rilevate a calotta, spesse, opache, grigio-biancastre, umide; a piccolo ingrandimento appaiono di colore giallo-bruno, con struttura finamente granulosa, con margini regolari, talora nucleate. Alcune colonie sono leggermente lobate ed hanno una struttura morulare. Le colonie profonde sono più piccole, di color bruno, con margini lisci o grossolanamente lobati.

Colonie in gelatina. — Le superficiali sono per lo più spesse, opache, umide, rilevate a calotta; alcune sono però sottili, semitrasparenti, cerulee, come quelle del B. del tifo. A piccolo ingrandimento appaiono di color giallo-bruno, finamente granulose, con margini regolari, od anche

ondulati, talora con struttura concentrica (v. fig. 520): alcune dimostrano però un accenno di solcature, e sono di color giallo chiaro o quasi incolore, per modo che non si possono facilmente distinguere dalle colonie di B. del tifo. Le colonie profonde hanno forma ellittica o di cote, sono di colore bruno intenso ed hanno contorno lobato; talora sono allungate, a salsicciotto, irregolarissime, in maniera da ricordare quelle di *Bact. vulgare*.

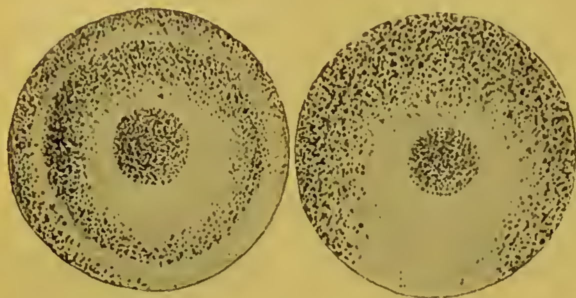


Fig. 520. — Colonie di *Bact. coli* in gelatina.

Cultura in brodo. — Intorbidamento notevole, con sedimento piuttosto abbondante, biancastro, fioccoso; talora vi è in superficie una evidente pellicola continua, sottile, grigiastra.

Strisciamento in agar. — Patina continua, uniforme, liscia, piuttosto spessa, opaca, grigio-biancastra, umida, con margini regolari. Acqua di condensazione coi caratteri della brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo, biancastro, piuttosto grosso: in superficie una colonia, molto espansa e lobata. Non vi è mai fluidificazione.

Coltura in latte. — Il *Bact. coli* si sviluppa rapidamente nel latte, acidificandolo e coagulandolo, per lo più dentro le 24-72 ore, in un cilindro compatto, nel quale rimangono incluse parecchie bolle di gas.

Strisciamento su patata. — Patina spessa, rilevata, untuosa, giallo-grigiastra in principio, poi giallo-bruna, con margini leggermente ondulati. La patata tutt'intorno alla patina appare alquanto imbrunita.

Attività biochimiche.

Il *Bact. coli* produce indolo, spesso in gran quantità, fenolo, mercaptano e molto idrogeno solforato. Vi sono però degli stipiti, certamente rari, che producono anche triptofane (Sampietro)..

Riduce i nitrati in nitriti e parecchie sostanze coloranti d'anilina nelle rispettive leucobasi.

Alcuni stipiti fermentano l'urea.

Attacca, con produzione di acidi e gas, i seguenti zuccheri ed alcoli: glicosio, lattosio, maltosio, galattosio, raffinosio, arabinosio; mannite, dulcite, sorbite. Attacca anche la destrina, non l'inulina; rispetto al saccarosio, alcuni stipiti lo scompongono, altri no. Ne risulta acido acetico, che prepondera nelle colture aerobiche, ed acido lattico, che prevale nelle anaerobiche; inoltre acido propionico e tracce di acido formico. La qualità ottica dell'acido lattico varia secondo la natura della sorgente

d'azoto nel sostrato colturale; se questa è rappresentata dal peptone, l'acido lattico è levogiro; se dall'ammoniaca, è per lo più destrogiro.

Produce fluorescenza nel terreno di Rothberger ordinario, trascoloramento in rosso lampone nel terreno omonimo modificato da Segale.

Azione patogena.

Sono recettivi i conigli, le cavie, i topi, i ratti, i cani, i gatti e molte altre specie animali.

La virulenza del *Bact. coli* è molto variabile, nè ha rapporto alcuno con l'intensità delle proprietà fermentative.

Inoculato sotto cute, talora non produce altro che suppurazione locale, il che è indizio di poca virulenza; se è molto virulento, produce nel punto d'iniezione un edema gelatinoso circoscritto, che può essere soffuso di sangue, ed uccide l'animale per setticemia in 24-48 ore. Iniettato nel peritoneo, produce la morte delle cavie in 24-48 ore, con peritonite e con reperto bacillare nel sangue. Se gli animali non soccombono troppo presto, presentano sintomi di enterite, che non ha nulla di caratteristico e somiglia a quella provocata dall'iniezione di bacilli tifosi, paratifosi o dissenterici.

Alla sezione non si notano lesioni speciali: vi è congestione dei visceri, iperemia intensa della mucosa intestinale, talvolta con infiltrazioni emorragiche e tumefazione dei follicoli linfatici, alla cui superficie possono osservarsi qualche volta evidenti erosioni epiteliali.

Veleni.

I filtrati di vecchie brodocolture di *Bact. coli* dimostrano un'azione tossica, non però molto forte, per gli animali d'esperimento (Levi della Vida). Carega, concentrando a 45° delle brodocolture di 12 giorni, precipitando con alcool, ed estraendo il precipitato con liscivia sodica al 0.5 % ottenne due sostanze: una insolubile ed una solubile ma precipitabile con acido acetico: la prima viene distrutta dal riscaldamento a 100° ed uccide il coniglio rapidamente, se inoculata in dosi di pochi centigr.; la seconda è cottostabile, ed inoculata anche in dosi minori nelle vene, produce la morte in pochi minuti. La prima può ben rappresentare una endotossina, la seconda somiglia per gli effetti ad un nucleoproteide.

È stato anche dimostrato un forte potere aggressinico (De Blasi).

Azione antigena.

Si possono immunizzare gli animali verso il *Bact. coli* inoculando loro colture uccise o vive o prodotti batterici in quantità gradatamente crescenti. Gli anticorpi ricercati e trovati nel siero di tali animali sono

principalmente le agglutinine, che si trovano in concentrazione non molto rilevante. È importante il fatto stabilito da Jatta e confermato da altri, che la specificità delle agglutinine è ristretta allo stipite adoperato per l'immunizzazione: contro questa regola non hanno alcun valore, s'intende, le eventuali reazioni di gruppo. Più stipiti dunque di *Bact. coli*, identici per tutti i loro caratteri morfologici e colturali, si distinguono per i recettori agglutinogeni.

È da rammentare che su questo germe fu per la prima volta dimostrata da Pfaundler quella speciale reazione dei sieri agglutinanti specifici, che si svolge durante 24 ore d'azione e consiste nella formazione di lunghi filamenti aggrovigliati fra loro.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento del *Bact. coli* è dei più facili: qualunque terreno solidificabile in piastre serve allo scopo; ottimo in ogni modo è l'agar Drigalski e Conradi, sul quale il germe dà colonie spiccatamente rosse. Bisogna tuttavia avvertire che vi sono stipiti i quali, attaccando molto lentamente il lattosio, dànno colonie turchine anche dopo 24 ore e più d'incubazione.

L'identificazione non offre difficoltà, quando si tengono presenti i caratteri colturali e sopra tutto le proprietà fermentative ricordate. È bene ricordare che vi è un *Bact. coli immobile*, senza ciglia, un *Bact. coli polare*, provvisto di un solo ciglio o di due, uno per polo, ed un *Bact. coli anindolicum*, che non produce indolo: tutti e tre nel resto sono identici al *Bact. coli commune.*

Bacterium coli dysentericum

o *B. colidissenterico di Celli.*

Durante un'epidemia dissenterica in Egitto, nel 1895, il Celli isolò dalle feci dei malati un bacillo, cui riconobbe speciali proprietà tossiche e pose nome di *Bacterium coli dysentericum* per significare insieme la sua affinità col *Bact. coli* ed il suo etiologico rapporto con l'infezione. Che il *Bact. coli*, esaltato o vogliam dire anche, secondo il concetto di Celli, specializzato nella sua virulenza, possa dare forme gravi di dissenteria sporadica ed epidemica, risulta confermata da ulteriori indagini di Valagussa, di Vincenzi, di Galli-Valerio, di Nakao Abe, ecc.; senza dire che della stessa interpretazione sono probabilmente suscettivi i reperti batteriologici precedenti di Maggiora, Ogata, Arnaud ed altri.

Secondo Celli, il *Bact. coli*, trovandosi in simbiosi con dei protei e dei tifosimili, si modifica e sopra tutto acquista una speciale virulenza, diventando così capace di produrre forme dissenteriche. Dalle colture

fu ottenuto un veleno potente con azione elettiva sul grosso intestino del gatto.

Celli e Valenti riconobbero a questo germe, qualche anno dopo l'isolamento, la capacità di attaccare gli zuccheri con formazione di piccole bollicine di gas, e di coagulare il latte con molta lentezza ed in fiocchi molli; lo scrivente, ristudiandolo più tardi, lo trovò mancante di tali proprietà, con caratteri che lo distinguono da altri germi affini e che lo accostano ad altri tipi di B. dissenterico posteriormente isolati, specialmente a quello di Flexner, dal quale tuttavia è pur sempre diverso a cagione della mobilità. Può la differenza fra i caratteri descritti in origine e gli attuali essere semplicemente addebitata alla perdita di alcune attività biochimiche: così essendo, tale perdita è stata definitiva, poichè il germe si presenta ora costantemente sfornito delle proprietà indicate.

A dare la descrizione del germe coi caratteri attuali lo scrivente è mosso dal fatto che in qualche caso di enterocolite dissenterica dei bambini è stato isolato uno stipite identico, tale cioè che fin dal momento in cui fu ottenuto dalle feci si mostrò sempre sfornito delle proprietà di produrre gas dagli zuccheri e di coagulare il latte: esso era inoltre agglutinato specificamente dal siero agglutinante di conigli immunizzati col B. di Celli.

Caratteri microscopici.

Il *Bact. coli dysentericum* ha caratteri morfologici in tutto simili al *Bact. coli commune*, compreso il movimento di traslazione, abbastanza vivace, dovuto ad una corona di 6-8 ciglia.

Colture artificiali.

Le condizioni di sviluppo sono identiche a quelle già dette per il *Bact. coli*.

Colonie in agar e in gelatina. — Le colonie superficiali appartengono a due tipi, che maggiormente si distinguono in gelatina. Alcune sono rotondeggianti, piane, piuttosto sottili, semitrasparenti, con riflessi cerulei, ed a piccolo ingrandimento appaiono di color giallo chiaro, omogenee o finamente granulose, con margini ondulati, talora nucleate, non mai solcate. Le altre sono più piccole, rilevate a calotta, opache, ed al microscopio appaiono di color giallo bruno, uniformemente granulose, con margini rotondi. Le colonie del secondo aspetto somigliano quindi maggiormente a quelle tipiche di *Bact. coli commune*.

Colture in brodo, su agar e su patata a strisciamento, in gelatina per infissione. — Sono in tutto simili a quelle del *Bact. coli commune*.

Coltura in latte. — Il B. di Celli si sviluppa nel latte, senza coagularlo e senza rischiararlo, neppure dopo molti giorni di incubazione a 37°.

Anche negativa riesce la prova di Biffi (v. pag. 1276).

Vitalità in coltura. — Lunga e facilmente conservabile, come quella del *Bact. coli*.

Attività biochimiche.

Questo germe produce piccole quantità d'indolo; attacca il glicosio e la mannite con produzione di acidi soltanto, non di gas.

Non attacca il lattosio; perciò dà colonie turchine sul terreno Drigalski e Conradi.

Nel terreno di Rothberger non dà alcuna fluorescenza.

Azione patogena.

Il criterio sul quale Celli fondò la distinzione del *Bact. coli dysentericum* è appunto quello dell'azione patogena. Gli erbivori e gli uccelli sono poco recettivi; recettivissimi sono invece i piccoli cani e più ancora i gatti. Questi, infettati per la via intestinale, ammalano e muoiono di dissenteria entro 2-15 giorni, e presentano alla sezione alterazioni localizzate principalmente nella mucosa del crasso, che è intensamente iperemica, cosparsa d'infiltrazioni emorragiche. Se gli animali soccombono tardivamente, vanno incontro a un evidente stato marantico, senza manifeste lesioni locali.

Veleni.

I filtrati di brodocolture invecchiate sono tossici, ma ne occorre una forte quantità per uccidere gli animali d'esperimento.

Celli preparò una sostanza tossica, che ha i caratteri di una endotossina, precipitando con alcool i filtrati delle brodocolture, decantando il liquido, raccogliendo il precipitato sul filtro ed essiccandolo nel vuoto: tale sostanza, friabile, bianca o grigia cornea, si conserva secca all'oscuro, sotto campana contenente cloruro di calcio.

Questa tossina, iniettata sotto cute o nel peritoneo nella quantità di pochi cgr., conduce a morte i gatti con vomito e grande abbattimento dentro le 24 ore: alla sezione si nota infiltrazione edematosa ed emorragica del crasso, ed iperemia nell'ultima parte del digiuno.

Gli stessi effetti si hanno inoculando più volte minime dosi gradatamente crescenti; si stabilisce inoltre uno stato marantico grave ed alla sezione si riscontrano ulcerazioni della mucosa del crasso. Nei punti di inoculazione osservasi una zona di necrosi, talora solo un'infiltrazione purulenta.

La tossina ha dunque una triplice azione: generale marantica, locale piogena o necrosante, elettiva sul crasso con effetti emorragici od ulcerativi.

Azione antigena.

Celli e Valenti immunizzarono degli asini con la tossina di cui è stato parlato, ed ottennero un siero con proprietà agglutinanti specifiche per il *Bact. coli dysentericum*. Questo siero aveva inoltre efficacia preventiva e curativa nelle esperienze fatte sugli animali letalmente intossicati od infettati. Questo siero fu adoperato con vantaggio anche nella cura di parecchi casi di dissenteria sporadica ed epidemica (Valagussa, Berghinz, Corseri ed altri).

Isolamento e identificazione.

L'isolamento può farsi su terreno Drigalski e Conradi, con metodo simile a quello indicato per il B. del tifo; le colonie che vi nascono sono turchine.

Per l'identificazione del tipo qui descritto, si tenga presente che esso diversifica dal *Bact. coli*, perchè non produce gas, non attacca il lattosio neppure con produzione di acidi, e non coagula il latte, neppure con la prova di Biffi.

Dal germe isolato da Ito Sukeito in un'epidemia di *ekiri* (dissenteria dei bambini) si distingue perchè questo, mentre non coagula il latte, produce però gas dal glicosio.

Bacterium dysenteriae
o *B. di Shiga-Kruse.*

Nel 1898 lo Shiga nel Giappone ed il Kruse nel 1900 in Germania, durante epidemie dissenteriche, isolarono dalle feci dei malati una medesima specie batterica, diversa però da quella del Celli. Diversa da queste due un'altra ne isolò il Flexner in occasione di epidemie scoppiate lungo le coste occidentali degli Stati Uniti d'America e nelle Isole Filippine. Di queste due varietà la meglio differenziata e d'assai la più frequente è quella di Shiga-Kruse, la più rara è quella di Flexner. Bisogna inoltre aggiungere che altre varietà sono state poi rinvenute in altre epidemie.

Si trova solo nell'intestino e nel suo apparato linfatico, non mai nel sangue e negli organi dei malati. Anche viene eliminato con le feci dei convalescenti.

Caratteri microscopici.

Bastoncini simili a quelli del *Bact. coli*, di solito più snelli, asporogeni, sprovvisti di movimento di traslazione, ma dotati di vivacissimi movimenti vibratorî, senza ciglia. Vedder e Duval trovarono il *Bact.*

dysenteriae ciliato, ma ciò non ostante immobile. La colorazione è facile con qualsiasi colore basico d'anilina, non avviene però col metodo del Gram. Raramente si vedono filamenti, però spesso forme involutive.

Colture.

Le condizioni di sviluppo nelle colture artificiali sono le medesime che per il *Bact. coli.*

Colonie in agar e in gelatina. — Le superficiali sono in generale colonie tifosimili, quindi delicate, con margini ondulati o frastagliati e con solcature: ve ne sono però di quelle con margini e superficie uniformi, finamente granulose. Le colonie profonde non hanno alcun che di caratteristico.

Coltura in brodo. — Intorbidamento leggiero ed uniforme, senza pellicola in superficie, con debole sedimento biancastro fioccoso al fondo: il liquido si chiarifica alquanto dopo alcuni giorni.

Strisciamenti su agar e su patata. — Hanno gli stessi caratteri delle omonime colture di *Bact. typhi*; soltanto la patina su patata è un po' più evidente, e col tempo diventa bruniccia.

Infissione in gelatina. — Sviluppo simile a quello del B. del tifo: in superficie una delicata colonia, spesso abbastanza estesa. Niente fluidificazione.

Coltura in latte. — Il germe si sviluppa senza mai coagularlo nè rischiararlo.

Vitalità in coltura. — Le colture di *Bact. dysenteriae* si conservano vitali per lungo tempo, come quelle del *Bact. typhi.*

Attività biochimiche.

Il *Bact. dysenteriae* Shiga-Kruse non produce mai indolo.

Non attacca in nessun modo il lattosio e la mannite; attacca il glicosio con leggiera e tardiva produzione di acidi; acidifica leggermente il siero di latte Petruschky; non riduce nè trascolora il rosso neutro del terreno di Rothberger.

La varietà di Flexner ha gli stessi caratteri, salvo che produce minime quantità d'indolo ed attacca la mannite con produzione di acidi. Altre varietà si distinguono dal tipo Shiga-Kruse per la proprietà di attaccare in tal modo la mannite: onde sono state distinte complessivamente col nome di Bacilli dissenterici fermentatori di mannite.

Le colture del *Bact. dysenteriae* tramandano un caratteristico odore di sperma.

Azione patogena.

Sono molto recettivi i conigli, le scimmie, i gatti, i cani; meno le cavie, i topi, i cavalli e gli asini.

Somministrate per via intestinale, le colture di *Bact. dysenteriae* non producono la dissenteria: fanno eccezione alcune esperienze eseguite da Shiga su animali giovanissimi, e sulle scimmie. Inoculate nelle vene o nel peritoneo, producono la morte degli animali con enterite grave, ma senza lesioni caratteristiche; si notano alla sezione iperemia delle sierose e della mucosa del tenue, con emorragie ed essudati.

Veleni.

Inoculando nei conigli, sotto cute o nelle vene, o nel peritoneo, colture di *Bact. dysenteriae* uccise, se ne produce la morte con sintomi e lesioni simili a quelli che conseguono all'infezione con colture vive: l'immunizzazione dei piccoli animali riesce, per questo fatto, assai difficile.

Conradi, iniettando agarcolture fresche uccise od autolizzate, anche in piccolissime dosi, nelle vene dei conigli, ne ebbe la morte con paralisi e convulsioni, e con emorragie principalmente nella mucosa del tenue, ma anche del crasso. Effetti consimili ottennero Neisser e Shiga ed altri autori, iniettando degli estratti ottenuti col metodo di questi due autori (v. p. 1302); Lüdke iniettando i prodotti ottenuti col metodo di Macfadyen; Besredka inoculando estratti ottenuti col suo metodo; ed altri con altri procedimenti. La potenza tossica dei vari preparati risulta dalla piccolezza della dose minima letale, che corrisponde in genere a 0.03-0.003 mgr. di massa batterica umida. Anche filtrando delle brodocolture di 2-3 settimane si ottengono liquidi assai tossici.

Da queste ricerche risulta nel complesso che il B. dissenterico ha un'endotossina; ma Rosenthal e poi Kraus poterono dimostrare che esso produce anche una vera esotossina, relativamente termolabile e dotata di spiccato potere antigeno, come le esotossine in generale.

Kruse infatti ha potuto separare le due specie di tossine: l'una agisce sul coniglio, non sulla cavia, e viene distrutta dal prolungato riscaldamento a 75-80°; l'altra agisce anche sulla cavia, purchè sia inoculata in dosi non piccole, ed è cottostabile. Questa è l'endotossina, quella è oramai da tutti considerata come esotossina.

Azione antigena.

Il *Bact. dysenteriae* ha potere antigeno, come già si desume dalle agglutinine specifiche presenti nel siero dei malati, e che possono essere utilizzate a scopo diagnostico con lo stesso metodo spiegato a proposito del *M. melitensis* (v. p. 1461) e del B. del tifo (v. p. 1502).

Mentre i piccoli animali difficilmente possono essere immunizzati verso il germe, ciò riesce bene invece nel cavallo e nell'asino. Così Shiga come Kruse, inoculando nel cavallo colture uccise o estratti di corpi batterici, ottennero sieri efficaci contro l'infezione sperimentale: quello di Shiga, in quantità di pochi mgr., protegge la cavia contro la iniezione di 5 dosi letali di coltura viva; similmente si comporta quello di Kruse. Questi sieri contengono agglutinine e batteriolisine specifiche dimostrabili *in vitro*. L'immunizzazione di animali sieroproduttori ha acquistato maggiore importanza dopo che Kraus e Doerr ebbero provato che, inoculando loro i filtrati di brodocolture anche fresche, quindi un'esotossina, si può ottenere un attivissimo siero antitossico. Tale siero ha virtù protettiva e curativa, anche in dosi piccolissime.

Ora si preparano dei sieri multiparziali immunizzando il cavallo, con prodotti tossici delle diverse varietà di B. dissenterico; essi vengono usati in pratica nella cura della dissenteria epidemica.

Isolamento e identificazione.

Il *Bact. dysenteriae* si isola dalle feci sul terreno Drigalski e Conradi, assai più facilmente che il B. del tifo. Su questo terreno dà colonie simili a quelle del B. di Eberth, alquanto più grandi, più turchine, piane, umide, con margini talora lievemente ondulati.

L'identificazione va fatta tenendo conto di tutti i caratteri descritti.

Per distinguere il tipo Shiga-Kruse da tutte le altre varietà, si ricordi che esso solo non attacca la mannite. Per differenziare le altre varietà fra loro, si tenga conto della tabella sinottica che segue a questo capitolo.

Vi sono dei germi che sono stati chiamati pseudodissenterici o paradissenterici: secondo Kruse non solo vi si comprendono tutti quelli che si distinguono dal tipo Shiga-Kruse per alcuna delle proprietà colturali o fermentative, ma anche quelli che, essendogli identici per rispetto a queste, non si fanno agglutinare da un siero specifico per il detto tipo. Questa può dirsi tuttavia un'esagerazione; e tale è stata riconosciuta sempre più largamente dai vari autori che hanno avuto occasione di studiare etiologicamente diverse epidemie di dissenteria bacillare. La quale è una malattia che può essere cagionata da tipi batterici, per quanto affini fra loro, certamente diversi. Il criterio dell'agglutinazione specifica dunque non può nè deve servire ad altro che a differenziare le varietà.

Bacilli enterici.

Specie	Indolo	Glicosio	Lattosio	Maltosio	Saccarosio	Mannite	Destrina
Bact. typhi	—	A	—	A	—	A	—
» *paratyphi A*	—	+	—	A	—	A	—
» » *B*	—	+	—	A	—	A	—
» *coli comune*	+	+	+	+	A ±	+	+
» *ekiri*	+	+	—	..	..	..	..
» *coli dysentericum* Celli	±	A	—	A	—	A	..
» *dysenteriae* I (Shiga)	—	A	—	—	—	—	—
» » II (B. Y di Hiss e Russell)	±	A	—	—	—	A	—
» » III (B. di Strong)	±	A	—	—	A	A	—
» » IV (B. di Flexner)	±	A	—	A	A	A	A

In questa tabella, nelle colonne indicanti l'azione sugli zuccheri, il segno + vuol dire produzione di acidi e gas; il segno ± produzione incostante dei medesimi, la lettera *A* produzione di soli acidi; il segno — mancanza di fermentazione; il segno ... mancanza di dati.

Nella prima colonna il segno ± vuol dire quantità leggiera di indolo. I due Bb. paratifosi fra loro distinguonsi, come è stato detto, per le colture su patata, in latte ed in terreno Rothberger modificato da Segale.

Batteri mucosi

o *Batteri capsulati.*

Si comprendono sotto questa denominazione collettiva alcune specie batteriche tanto affini fra loro che non accade farne la descrizione separata. Queste specie sono:

Bact. pneumoniae, o pneumobacillo di Friedländer, che lo scoprì nel 1882.

Bact. ozaenae, o B. mucoso dell'ozena, trovato da Abel nel 1893.

Bact. rhinoscleromatis, o B. del rinoscleroma, visto da von Frisch nel 1882 ed isolato poi da Paltauf e von Eiselsberg nel 1886: è considerato come causa di questo singolare granuloma.

Bact. acidi lactici, o B. dell'acido lattico di Hueppe, che lo scoprì nel 1884.

Bact. lactis aërogenes, descritto da Escherich nel 1886, e trovato nell'intestino dei poppanti.

Il bacillo di Hueppe si trova spesso nel latte acido.

Il bacillo aerogene di Escherich può isolarsi, come abbiamo detto, dalle deiezioni dei poppanti.

Caratteri microscopici.

Sono tutti bastoncini delle dimensioni di 0.5-0.7 × 1-3 μ, con estremità arrotondate, isolati, talora accoppiati, più raramente in forma di brevi filamenti; asporogeni, immobili, senza ciglia, ben colorabili, non resistenti al

Gram, tranne quello del B. dell'acido lattico. Nell'organismo animale, nelle colture in sostrati contenenti del siero di sangue, ed anche, benchè più di rado, in sostrati ordinari, presentano una capsula di aspetto gelatinoso, più o meno evidente e spessa. Questa è la ragione del loro nome collettivo di batteri capsulati.

Colture.

Crescono rigogliosamente tutti in aerobiosi ed anaerobiosi, in qualsiasi terreno di coltura; hanno l'ottimo di temperatura a 35 37°, ma si moltiplicano anche a 15° ed a 44°.

Quale più quale meno delle diverse specie nominate, dànno colture di aspetto mucoso e di consistenza filante: questa proprietà è minima per il *Bact. pneumoniae*, il *Bact. acidi lactici* ed il *Bact. lactis aërogenes* ed è specialmente spiccata per il B. dell'ozena e per quello del rinoscleroma.

Il B. di Friedländer si trova nell'espettorato di un piccolissimo numero di casi di pneumonite e di bronchite; si trova anche insieme con lo pneumococco, nell'espettorato di persone affette da pneumonite cruposa genuina; è stato anche trovato qualche volta in focolai flogistici, in organi diversi, più raramente nel sangue, e considerato allora come causa di setticemie. Non di rado trovasi anche nell'urina, solo o col *Bact. coli*, in casi di pielite o di cistite.

Per ciò che riguarda gli animali domestici, ricordiamo che Schütz isolò in alcune forme di pleuropneumonite dei cavalli un germe identico a quello di Friedländer.

Il B. dell'ozena trovasi nell'essudato caratteristico ed alla superficie mucosa delle cavità nasali, tanto nello stadio ipertrofico, quanto nello stadio atrofico di questa malattia. Lo scrivente ha avuto occasione di coltivarlo in quattro casi di ozena, costantemente ottenendo, nelle colture a piatto d'isolamento, quasi soltanto delle colonie mucose caratteristiche, oppure insieme con queste anche colonie di stafilococchi.

Il bacillo del rinoscleroma trovasi nei noduli di quest'affezione locale della mucosa delle cavità nasale, nasofaringea ed orale. In un caso tipico, avanzato, in cui le narici erano già saldate e vi erano altre deformazioni ripugnanti ed afonia per localizzazione laringea, lo scrivente ebbe occasione di isolarlo in coltura pura dal contenuto di noduli accuratamente detersi e lavati con soluzione fisiologica sterile e poi triturati. La mucosità è caratteristica ed evidentissima nelle colture d'isolamento e nelle prime di passaggio; meno spiccata nelle colture successive.

Il B. dell'acido lattico e il B. aerogene dànno spesso colture in cui non è riconoscibile l'aspetto mucoso.

Colonie in agar. — Le superficiali sono rotonde, del diametro di 2-3 mm., biancastre, fortemente rilevate a calotta, opache, con margini lisci, d'aspetto più o meno mucoso: a piccolo ingrandimento mostrano contorno regolare e netto, colore giallo bruno, aspetto omogeneo; talora sono segnate da linee radiali, che con aspetto di aculei o di punte spiccano, per il loro colore bruno intenso, sul fondo della colonia.

Le colonie profonde sono ancora più scure, ed hanno forma ellittica o di cote.

Colonie in gelatina. — Somigliano in tutto a quelle che nascono sull'agar; sono soltanto meno rigogliose.

Coltura in brodo. — Forte intorbidamento uniforme; sedimento grigio-biancastro, più o meno mucoso, che spandendosi nel liquido allorchè questo si agita, lo rende più denso, talora quasi viscido.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, liscia, biancastra, spessa, opaca, più o meno mucosa, con margini lisci. Acqua di condensazione come la brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Nastriuo continuo, piuttosto grosso, biancastro; in superficie una colonia rilevata a calotta; la gelatina non è mai fluidificata. Vista di lato, tutta l'infissione ricorda l'aspetto di un chiodo con la testa convessa.

Coltura in latte. — Si sviluppano tutti nel latte. Il B. dell'acido lattico ed il B. aerogene lo coagulano rapidamente, ed il coagulo è compatto ed attraversato da bollicine di gas.

Il *Bact. pneumoniae*, il *Bact. ozaenae* ed il *Bact. rhinoscleromatis* non producono la coagulazione, neppure dopo 2-3 settimane.

Strisciamento su patata. — Patina simile a quella su agar, ma più spessa, untuosa, viscosa, di colore giallo chiaro o giallo bruno, con margini ondulati, che finiscono coi disgregarsi in massettine irregolari, in forma di salsicciotti. Si vedono talora sulla patata, intorno alla coltura, piccole bollicine di gas.

Attività biochimiche.

Producono in generale poco indolo e poco idrogeno solforato, ma incostantemente.

Scindono tutti, con produzione di acidi e di gas, il glicosio, il maltosio, il raffinosio, il levulosio, il galattosio, l'arabinosio, la mannite, la sorbite, la destrina, l'amido; nessuno attacca l'inulina.

Il *Bact. pneumoniae* produce dal lattosio talora soltanto piccole quantità di acidi, non mai gas. Esso distinguesi dal B. di Hueppe e da quello di Escherich perchè fermenta la dulcite, con produzione anche di gas, mentre questi due non l'attaccano ed attaccano invece il lattosio con produzione di gas.

Il *Bact. acidi lactici* si distingue dal B. di Friedländer e da quello di Escherich perchè non attacca il saccarosio, mentre questi due lo scindono con produzione di acidi e di gas.

Bisogna tuttavia avvertire che i dati sul potere fermentativo degli zuccheri sono contradittorî, il che probabilmente dipende dal fatto che per ciascun genere di questo gruppo tale potere è incostante. Bertarelli ha visto, per esempio, che tutti quanti, anche il *Bact. pneumoniae*, producono gas dal lattosio; che del *Bact. ozaenae* qualche stipite produce gas dal saccarosio, qualche altro no; che il B. del rinoscleroma attaccando questo zucchero non dà gas, mentre lo dà scindendo il glicosio ed il lattosio.

Secondo Bertarelli il criterio della quantità di acidi prodotti per l'azione sugli zuccheri può meglio di altri servire a distinguere questo gruppo di germi: in uu sottogruppo possono essere compresi il B. di Escherich e quello di Friedländer, che producono molti acidi del glicosio, dal lattosio, dal sac-

carosio; nell'altro sottogruppo trovano posto il B. dell'ozena e quello del rinoscleroma, che ne producono piccole quantità.

Fra i prodotti della fermentazione sono dimostrabili l'alcool etilico, l'acido acetico, poco acido formico e poco acido succinico (Frankland). Naturalmente non manca l'acido lattico, che per lo più è levogiro.

Il gas è composto di idrogeno ed anidride carbonica: mentre per il *Bact. lactis aërogenes* il rapporto fra questi due gas prodotti dal glicosio è minore di 1, per gli altri invece è maggiore: si nota questo fatto per il primo sotto la formula $H_2 : CO_2 < 1$; per gli altri $H_2 : CO_2 > 1$.

Spesso tutti questi germi dànno la reazione di Voges e Proskauer (vedi pag. 1292).

Azione patogena.

Quello che si conosce sull'azione patogena di questi germi si riferisce principalmente al B. di Friedländer e a quello di Abel, che sono patogeni per il topo, un po'meno per la cavia, quasi niente per il coniglio. Il B. del rinoscleroma non è patogeno per alcuno di questi animali. La virulenza dei due patogeni è per altro assai variabile, anche se l'isolamento loro è recente.

Bertarelli però ha visto che il *Bact. lactis aërogenes*, sia inoculato nel peritoneo che sotto cute, può dare nel topo una setticemia e la morte, laddove alcuni stipiti di B. dell'ozena e di B. del rinoscleroma possono essere quasi sprovvisti di azione patogena per lo stesso animale; come d'altra parte ha provato che alcuni stipiti di B. di Friedländer possono essere patogeni per il coniglio.

Poche gocce di coltura in brodo o di sospensione di agarcolture di stipiti patogeni in soluzione fisiologica, inoculate sotto cute nel topo o nella cavia, producono un ascesso con pus denso, cremoso, filante, nel quale i bacilli si presentano capsulati: questi passano poi in circolo, e fanno morire gli animali per setticemia. Alla sezione si notano spesso focolai di broncopolmonite e tumefazione splenica.

Nel coniglio l'iniezione sottocutanea di quantità forti di coltura produce soltanto una flogosi locale, che ha di solito esito in guarigione. Per uccidere il coniglio, occorre provocare in esso direttamente una setticemia, inoculandogli nelle vene parecchi cmc. di brodocoltura.

Azione antigena.

Riuscì a Bertarelli per primo di provare che i germi di questo gruppo hanno azione antigena. Per ottenere la formazione di anticorpi nei conigli, bisogna prolungare fino a 4-5 mesi l'immunizzazione, ed inoculare complessivamente quantità grandissime di massa colturale. Il titolo agglutinante dei sieri, conservandosi debolissimo per 2-3 mesi, raggiunge poi rapidamente valori di 1:200 - 1:400 - 1:1000. I sieri contengono anche piccole quantità di sostanze battericide e di sostanze fissatrici del complemento. I due sottogruppi, stabiliti in base alla differente produzione di acidi, diversificano anche per il potere antigeno, che è notevolmente maggiore nei germi produttori di molti acidi, minimo nei produttori di pochi acidi.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento dei germi di questo gruppo è facile: riesce nelle colture a piatto in gelatina o meglio in agar. Il carattere principale da tener presente è l'aspetto più o meno mucoso, il quale non manca mai alle colonie d'isolamento, e raggiunge il massimo grado per il B. dell'ozena.

L'identificazione rispetto ad altri tipi batterici è facile, sia per i caratteri microscopici, sia per i colturali. Distinguerli fra loro si può soltanto, e fino a un certo punto, per alcune proprietà fermentative; ma bisogna dire che, fra le indicazioni contraddittorie degli autori, non è facile raccapezzarsi. Diamo in ogni modo qui sotto un quadro che può servire ad una diagnosi approssimativa, che però non ha valore definitivo.

Pfeiffer isolò dall'essudato peritoneale viscoso di una cavia spontaneamente morta un bacillo capsulato: i caratteri di questo coincidono con quelli di Friedländer, quindi non se ne deve tener conto nella diagnosi.

Bordoni-Uffreduzzi, Banti e altri isolarono dall'uomo un bacillo capsulato, che fu detto proteo capsulato, e che è simile al B. di Friedländer, con l'unica differenza che resiste al metodo del Gram.

Con le riserve inposte da quanto è stato detto a proposito delle attività biochimiche, diamo il seguente specchietto diagnostico, i segni hanno lo stesso significato come nella tabella a pag. 1525.

Batteri mucosi o capsulati.

Specie	Mucosità	Coagulaz. latte	Saccarosio	Dulcite	$H_2 ; CO_2$
Bact. lactis aërogenes	—	+	+	—	< 1
» *acidi lactici*	—	+	—	—	> 1
» *pneumoniae*	±	—	+	+	> 1
» *ozaenae*	+++	—	±	..	..
» *rhinoscleromatis*	++	—	A	..	..

Batteri protei.

A questo gruppo appartengono quattro forme:

Bacterium vulgare o *Proteus vulgaris*, trovato da Hauser;
Bact. mirabile o *Proteus mirabilis*, trovato pure da Hauser;
Bact. zenkeri o *Proteus zenkeri*, trovato da Zenker;
Bact. zopfii o *Proteus zopfii*, trovato da Zopf.

Essendo agenti di putrefazione, possono trovarsi in qualsiasi materiale putrescente, e nelle feci dell'uomo e degli animali. Possono dare gravi catarri vescicali nell'uomo, quindi essere trovati nell'urina emessa con reazione alcalina per ammoniaca: spesso si accompagnano col *Bact. coli*.

Caratteri microscopici.

Tipicamente sono bastoncini larghi 0.5-0.6 μ e lunghi 2-4 μ, con estremità arrotondate, asporogeni, mobilissimi, peritrichi con moltissime ciglia, ben colorabili. Sono resistenti al Gram quando sono di recente isolati, in colture fresche; tale resistenza però è variabile di grado nei successivi trapianti, e nelle colture vecchie va perduta.

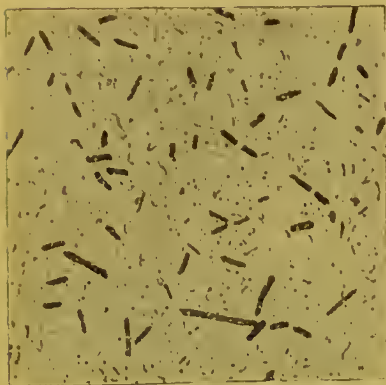


Fig. 521. — *Bact. vulgare.*

Accanto ai bastoncini descritti come tipici si osservano sempre forme cortissime e forme isodiametriche, simili a cocchi; catenelle e lunghi filamenti (v. fig. 521); non di rado forme curve come vibrioni, e spirali come spirilli. Da siffatta grande varietà di forme deriva a questo gruppo di germi l'appellativo di protei.

Sono frequenti inoltre le forme involutive, le quali assumono il massimo grado e gli aspetti più capricciosi nel *Bact. mirabile.*

Colture.

I protei si moltiplicano rigogliosamente in tutti i terreni di coltura, in aerobiosi ed in anaerobiosi, quasi egualmente bene a temperatura di stanza e a 37°, come anche a temperature bassissime.

Colonie in agar. — Le superficiali sono rotondeggianti, piane, grigio-biancastre, trasparenti, cerulee; a piccolo ingrandimento si presentano finissimamente granulose, giallastre nel centro, incolore nel resto, con margini che a poco a poco diventano irregolarissimi, lobati o digitati. Le colonie profonde sono fortemente granulose o morulari, grigio-giallastre.

Colonie in gelatina. — Le superficiali sono rotondeggianti, ma con orlo frastagliato, grige, delicate, trasparenti, con riflessi cerulei: per le forme che fluidificano la gelatina (*Bact. vulgare* e *Bact. mirabile*) si nota già prima delle 24 ore un alone di fluidificazione e l'approfondamento delle colonie. A piccolo ingrandimento si distinguono due tipi di colonie: alcune rotonde, grigio-giallastre, con margine liscio e netto, omogenee o punteggiate; altre incolore, trasparenti, con margini ondulati, profondamente lobati. Le seconde, crescendo, dimostrano in sè un vivace elegante brulichio delle masse batteriche; col procedere della fluidificazione, il movimento s'arresta, mentre il contorno delle colonie si fa sempre più irregolare, e non di rado ne partono delle zooglee, in forma di salsicciotti contorti, che si spingono nella gelatina circostante ancora solida.

Questo particolare è più evidente per il *Bact. zopfii*, ma può osservarsi anche per le altre forme, quando siano recentemente isolate. Le colonie del *Bact. zopfii* sono inoltre, a differenza di quelle delle altre forme, simili a colonie di ifomiceti, ma assai più delicate: si mostrano cioè composte da

una massa compatta di fascetti di filamenti aggrovigliati e da una corona di sottili propaggini lunghe, contorte e intrecciate, onde si staccano le zooglee.

Le colonie profonde sono piccole e poco caratteristiche; spesso presentano però propaggini filiformi alla periferia.

Coltura in brodo. — Intorbidamento forte, con sedimento copioso, biancastro, fioccoso, talora anche con tenue pellicola grigiastra in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina continua, liscia, diffusa fino alla parete del tubo, sottile, semiopaca, umida, cerulea. Acqua di condensazione come la brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Nastrino grigiobiancastro, continuo; in superficie una colonia espansa, ben visibile sopra tutto per le forme che non fluidificano (*Bact. zenkeri* e *Bact. zopfii*). La fluidificazione della gelatina si compie rapida, in forma di cilindro, per il *Bact. vulgare*; più lenta, in forma di coppa prima, e poi anche a cilindro, per il *Bact. mirabile*.

Il nastrino del *Bact. zopfii* porta delle barbe che s'irradiano ad esso perpendicolari, per quasi tutta la sua altezza, e sono più lunghe in alto e più brevi in basso. Con adatti espedienti tecnici è stato provato che le barbe crescono maggiormente nella direzione della forza di gravità e verso i tratti del sostrato nutritivo più riscaldati, presenta cioè fenomeni di barotropismo e di termotropismo positivi (Casagrandi).

Coltura in latte. — I protei si sviluppano nel latte, coagulandolo dopo 2-3 giorni, e poi fluidificandolo di nuovo con rischiaramento; più tardi il latte diventa giallognolo e leggermente acido.

Strisciamento su patata. — Patina per lo più ristretta, un po' rilevata, bianco-giallastra, di aspetto leggermente granuloso, con lucentezza grassa.

Attività biochimiche.

I protei dànno molto indolo e molto idrogeno solforato, fermentano potentemente l'urea, attaccano il glicosio ed il saccarosio con produzione di gas in quantità variabile, spesso abbondante, lasciano inalterato il lattosio. I gas prodotti sono CO_2 ed H_2 nel rapporto di 1:2. Dalle colture, chc hanno reazione fortemente alcalina, emana un intenso odore di putrefazione, il quale però manca se i terreni contengono zucchero. Nelle colture dei protei in sostrati carnei Carbone dimostrò la presenza di colina, etilendiammina, guanidina e trimetilamina, sostanze tossiche la cui produzione era stata complessivamente dimostrata da Hauser.

Inoltre i protei possono decomporre l'acido aminovalerianico producendone acido butirrico, attaccare la leucina con formazione di alcool amilico, formare dall'asparagina acido succinico ed ammoniaca. Hanno anche azione su altri aminoacidi, sulla tirosina, sulla fenilamina.

Azione patogena.

I topi, i conigli ed anche i cani, inoculati con grandi quantità di colture vive di stipiti poco virulenti, muoiono, secondo Meyerhof, per una vera infezione, poichè i germi si moltiplicano nell'organismo. In generale però,

inoculando sotto cute nei conigli colture anche virulente, si producono solo ascessi putridi.

È importante il fatto che i protei inoculati, sia vivi che morti, insieme con altre specie patogene, ne esaltano la virulenza.

Veleni.

Tanto i filtrati delle brodocolture quanto gli stessi corpi batterici uccisi col cloroformio hanno debole potere tossico.

Se però i filtrati provengono da colture in terreni speciali, come quelli adoperati da Carbone, dimostrano una tossicità grandissima, la quale è dovuta alle sostanze basiche già ricordate.

Azione antigena.

Carbone potè immunizzare degli animali inoculando loro i filtrati delle colture. Nel siero degli animali si riscontrano agglutinine specifiche.

Dimostrò inoltre che i protei, tenuti 24 ore in termostato e messi in presenza di siero specifico, crescono in lunghi filamenti che si aggrovigliano, come accade per il *Bact. coli*.

Isolamento e identificazione.

I protei si isolano tutti facilmente. Per l'identificazione si tengano presenti sopra tutto la variabilità delle forme, la mobilità, la resistenza al Gram, la forte produzione di alcali, l'odore delle colture, la coagulazione del latte. Per quanto le quattro specie nominate somiglino molto fra loro, e quindi la distinzione possa talvolta essere alquanto arbitraria, pure non sarà inutile avere sott'occhio il seguente quadro:

Specie	Variabilità delle forme	Formazione di zooglee	Fluidificazione della gelatina
Bact. vulgare	leggiera	—	+
» *mirabile*	grandissima	+	+
» *zenkeri*	leggiera	—	—
» *zopfii*	grande	+	—

Si avvicina ai protei il così detto *Bact. cloacae* di Jordan, ma se ne distingue per l'uniformità delle forme microscopiche e perchè attacca il lattosio con produzione di acidi e di gas.

Bacterium pyocyaneum

o *B. del pus verde.*

Fu trovato da Gessard nel pus verdastro di ferite aperte suppurate, come nelle medicature state a contatto di esso. Si trova talvolta anche sulla pelle, nella bocca e nel tubo digerente di persone sane. È stato trovato non di rado in alcune acque.

È considerato come patogeno specialmente per i bambini nei quali è stato riscontrato come causa unica di otiti medie, di pericarditi, di borsiti prepatellari; Wassermann ha osservato anche una piccola epidemia di infezione ombelicale da B. piocianeo.

Caratteri microscopici.

Bastoncini piuttosto snelli, delle dimensioni di 0.5-0.6 × 1.5-6 μ, diritti, con estremità arrotondate, asporogeni, mobilissimi, con un lungo ciglio polare, ben colorabili in genere, ed anche col metodo di Gram, purchè non si prolunghi la decolorazione.

Accanto alle forme tipiche si vedono degli elementi cortissimi, quasi rotondi, ed altri lunghissimi filamentosi. I filamenti abbondano nelle colture in brodo contenente 0.15 ‰ di bicromato potassico; nel brodo contenente 7 ‰ dello stesso sale preponderano forme curve e spirillari.

Caratteri colturali.

Il B. piocianeo si coltiva facilmente nei comuni sostrati nutritivi, per lo più solo in aerobiosi; l'ottimo di temperatura è 37°; il minimo 15°, il massimo 43°.

Colonie in agar. — Le superficiali sono rotondeggianti, piuttosto sottili, lucenti, semitrasparenti, gialloverdastre, con netta fluorescenza dei margini e del terreno circostante. A piccolo ingrandimento presentano contorno quasi regolare, colore giallochiaro o gialloverdastro, struttura granulosa od anche morulare.

Le colonie profonde sono più piccole, ed a piccolo ingrandimento presentano forma rotondeggiante o di cote, contorno leggermente ondulato, colore gialloverdastro, struttura punteggiata o granulosa.

Colonie in gelatina. — Le superficiali sono rotondeggianti, ma con margini lobati, piane, semitrasparenti; la gelatina intorno e sotto ad esse viene fluidificata, ed allora il contorno si disgrega intorbidando il sostrato liquefatto, mentre il grosso della colonia resta nel mezzo in forma di una massa grumosa. Intorno alle colonie il terreno presenta una forte fluorescenza. A piccolo ingrandimento appaiono in principio gialle, finamente punteggiate, con margini lobati, talora sfrangiati o forniti di propaggini filiformi; allorchè la fluidificazione è avanzata, appaiono di colore bruno, perdono in parte la eleganza del contorno lobato o sfrangiato, ed acquistano un aspetto granunuloso. Le colonie profonde non hanno alcun che di caratteristico.

Coltura in brodo. — Intorbidamento uniforme con forte fluorescenza verdastra; discreto sedimento biancastro e grumoso, non facilmente disgregabile per agitazione del liquido; pellicola continua, sottile, con riflessi gialloverdastri in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina continua, molto espansa, lucente, semitrasparente, liscia, giallo-verdastra, con margini ondulati. Acqua di condensazione come la brodocoltura, anche per ciò che concerne la pellicola superficiale. Il terreno è tutto di colore verdastro.

Infissione in gelatina — Nastrino continuo, biancogiallastro; fluidificazione rapida, prima a coppa, poi a cilindro, rarissimamente ad imbuto. La gelatina liquefatta è torbida, di colore gialloverdastro, fluorescente, e contiene fini grumetti specialmente sul fondo.

Strisciamento su patata. — Patina untuosa, con margini lobati, poco rilevata, in principio giallastra, poi giallo-bruna. Spesso intorno alla patina si vede una zona di fluorescenza.

Coltura in latte. — Il *Bact. pyocyaneum* cresce nel latte, che prima coagula e dopo fluidifica, rischiarandolo ed impartendo alla porzione rischiarata una fluorescenza gialloverdastra. La reazione del latte diventa alcalina.

Vitalità in coltura. — Le colture di questo germe si conservano a lungo, per mesi interi, anche quando vanno perdute alcune proprietà, come la virulenza e la produzione del pigmento speciale, che è la piocianina.

Attività biochimiche.

Il B. piocianeo non produce indolo nè idrogeno solforato. Riduce i nitrati in nitriti, e questi in azoto elementare; scinde il glicosio con produzione di acidi, non di gas.

Le colture fresche tramandano un lieve odore aromatico, che ricorda i fiori di tiglio; le colture vecchie emanano un odore sgradevole, ammoniacale.

I pigmenti sono due: la batteriofluoresceina e la piocianina, la quale può essere estratta con cloroformio e così separata dal primo pigmento, che nel detto liquido è insolubile. Il germe può in condizioni diverse perdere la proprietà di dare l'uno o l'altro pigmento, ed anche tutti e due. Più facimente occorrono stipiti che perdono soltanto la piocianina, nel qual caso mal si distinguono da alcuni batteri fluorescenti. La piocianina è di colore verdazzurro; può essere ossidata e diventare gialla, col nome di pioxantosi; può inoltre trasformarsi in sostanza rosso-bruna, alla quale è dovuta la colorazione bruna delle vecchie colture.

Emmerich e Loew ottennero dai corpi batterici del B. piocianeo una sostanza di natura enzimatica, cui posero nome di piocianasi. Essa è capace di sciogliere o almeno di alterare più o meno profondamente non solo i corpi batterici dello stesso B. piocianeo, ma anche quelli del B. del tifo, del B. della peste, del B. della difterite, del vibrione del colera, degli stafilococchi. La piocianasi è un fermento cottostabile.

Azione patogena.

All'infezione sono suscettivi il topo e la cavia, assai meno il coniglio.

Inoculando anche piccole quantità di coltura sotto cute nella cavia, si ha tumefazione locale seguita da ulcerazione: poi il germe passa in circolo

ed uccide l'animale in breve tempo. Più rapida avviene l'infezione quando l'inoculazione si fa nel peritoneo. Il sangue e gli organi della cavia morta sono pieni di germi. Nei topi accade lo stesso, e le alterazioni anatomiche appaiono più gravi: visceri fortemente congesti, mucosa intestinale iperemica con erosioni od ulcerazioni in corrispondenza dei follicoli linfatici; nel peritoneo, anche se l'iniezione fu fatta sotto cute, trovasi sempre alquanto liquido sieroso torbido.

Nel coniglio inoculando uno o più cmc. di brodocoltura, si provoca una infezione acuta mortale con febbre, diarrea ed albuminuria: alla sezione si trovano rari germi nel sangue, moltissimi nei reni. Inoculando dosi minori, si ottiene una infezione cronica, durante la quale il coniglio dimagra e presenta paralisi spastica degli arti posteriori.

Veleni.

I filtrati delle brodocolture, iniettati nel coniglio, ne producono la morte coi sintomi e le alterazioni proprie della infezione; lo stesso effetto hanno i corpi batterici uccisi col toluolo.

Secondo le ricerche di Wassermann, il B. piocianeo produce una vera e propria tossina solubile.

Azione antigena.

Si possono verso il B. piocianeo immunizzare dei conigli, inoculando loro sotto cute piccole quantità di brodocolture intere, per cinque o sei volte, con tre o quattro giorni d'intervallo. Lo stesso effetto si ottiene inoculando colture filtrate o riscaldate a 115°. Il siero ha proprietà agglutinanti ed antitossiche.

Isolamento e identificazione.

Questo germe si isola facilmente tanto in agar quanto in gelatina.

Quanto all'identificazione, allorchè si tratta di stipiti recentemente isolati, bisogna por mente in particolar modo alla presenza della piocianina, che rappresenta si può dire il solo carattere distintivo rispetto al *Bact. fluorescens*.

Il *Bact. putridum*, che è anch'esso un fluorescente, si distingue, oltre che per la mancanza di piocianina, anche perchè non fluidifica la gelatina: si chiama infatti anche *Bact. fluorescens non liquefaciens*.

Bacterium diphteriae

o *Corynebacterium diphteriae, B. della difterite, B. di Klebs e Löffler.*

Scoperto da Klebs nel 1883, fu ottenuto in coltura pura da Löffler nel 1884.

Si trova nelle pseudomembrane dei difterici, sia che si formino nella mucosa faringea o laringea o tracheale o nasale; inoltre sulle stesse mucose già guarite dei convalescenti, come anche nella cavità orale di

persone sane, che non hanno mai sofferto la difterite (portatori). Nell'ambiente si trova su oggetti che sono stati a contatto o in vicinanza dei malati (biancheria, giocattoli, ecc.) e sul pavimento e sulle pareti delle stanze in cui essi hanno passato la malattia.

Caratteri microscopici.

Bastoncini snelli, larghi circa 0.5 μ e lunghi 2-4 μ, diritti o leggermente incurvati, con estremità arrotondate, più di rado affilate, più spesso rigonfiate a clava; sono immobili, senza ciglia, asporogeni, talvolta uniformemente, tal altra discontinuamente colorabili, resistenti al metodo del Gram.

Per effetto dei rigonfiamenti terminali, si hanno figure piriformi o a manubrio. Nelle vecchie colture s'incontrano spesso bastoncini clavati, che si colorano a tratti, mentre le porzioni intermedie restano scolorate. Al metodo del Gram i bacilli difterici resistono quando son giovani, ed a patto che non si ecceda nella decolorazione. Il particolare più importante nella colorazione di questi germi è dato dai granuli cromotropi, o, come oramai comunemente si dice, metacromatici, o di Babes-Ernst (v. p. 1363): sono per lo più in numero di due, collocati verso i poli, onde chiamansi anche granuli polari (v. Tav. V, fig. 1). Vi sono però sempre individui senza granuli, altri con uno solo, altri infine con più di due. Nelle colture su agar e su patata prevalgono le forme cilindriche senza rigonfiamenti, nelle colture su siero di sangue preponderano le forme clavate o a manubrio: il nome di *Corynebacterium*, proposto da Lehmann e Neumann per indicare il genere cui appartiene il bacillo difterico insieme con quello della morva e con quello della xerosi, fu suggerito appunto dalle forme clavate (κορύνη = clava).

Nelle vecchie colture si possono vedere forme brevemente ramificate, le quali si interpretano come indice di loro parentela con gli Attinomiceti (v. più oltre il rispettivo capitolo).

Concetti isolò da un caso di laringite un germe, che cresceva da principio in anaerobiosi e somigliava ad un *Actinomyces*, e poi finì col dare tipiche colture di B. difterico.

Per ciò che concerne l'aggruppamento, accanto alle forme isolate, s'incontrano bastoncini incrociati, o giustapposti in numero di 3-4 o più a guisa di palizzata, oppure riuniti come le stecche d'un ventaglio aperto, od anche irregolarmente ammucchiati.

Colture.

Il B. della difterite cresce nei terreni di coltura comuni, meglio se glicerinati, meglio ancora in terreni contenenti siero o liquido ascitico, sia che abbiano reazione neutra o leggermente acida od alcalina. È

aerobio, ma si moltiplica anche, benchè stentatamente, in relativa anaerobiosi; l'ottimo di temperatura è 35°-37°, il minimo 18°-20°, il massimo 40°.

Colonie su agar glicerinato. — Le superficiali sono rotondeggianti, grigiobiancastre, con tendenza al giallo sporco, poco lucenti, poco rilevate, con margini lisci. Oltre a queste colonie piccole, che si dicono microcolonie, ve ne sono di assai più grandi, dette macrocolonie, e caratterizzate da una parte centrale o nucleo, più rilevato e più opaco del resto.



Fig. 522. — Colonie di B. difterico in agar glicerinato: contorno regolare.

A piccolo ingrandimento appaiono dopo 24 ore trasparenti, di color giallo-grigiastro, coi margini regolari (v. fig. 522) o irregolarmente sfrangiati e molto granulosi. Dopo 48 ore nella parte centrale sono opache, di color giallo-bruno, e presentano margini ancora più irregolari e granulosi che le colonie giovani (v. fig. 523).

Colonie su siero Loeffler. — Sono rotonde, piuttosto spesse ed opache, e finamente granulose. Questo tipo di colonie si osserva del resto anche su agar glicerinato, benchè con assai minor frequenza.

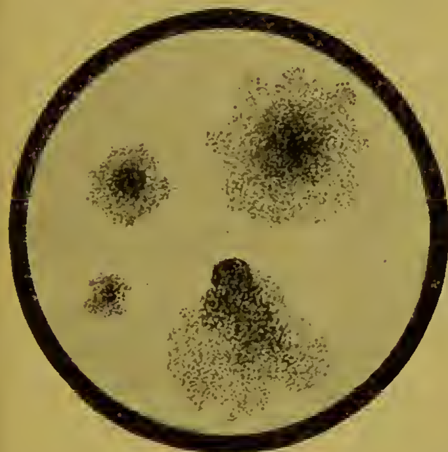


Fig. 523. — Colonie di B. difterico in agar glicerinato: contorno irregolare.

Coltura in brodo. — Manca l'intorbidamento, oppure se avviene è leggerissimo e transitorio; sul fondo e sulle pareti della provetta si vedono minutissimi granulini; in superficie notasi una pellicola discontinua, grigia, arida, più o meno delicata.

Strisciamento su agar glicerinato. — Patina per lo più continua, semitrasparente, grigiastra, poco rilevata, finissimamente granulosa, arida, talora circondata da un orlo più trasparente largo circa un mm.; spesso intorno ai margini si vedono microcolonie e macrocolonie isolate.

Coltura in latte. — Il B. difterico cresce nel latte rigogliosamente, senza neppure alterarne la reazione.

Strisciamento su patata. — Accrescimento lento e meschino, anche se si provvede all'alcalinità del terreno. Patina delicata, grigiastra, con aspetto di sottilissimo velo, che facilmente si lascia talvolta sollevare con l'ago di platino.

Vitalità in coltura. — Il B. difterico si conserva nelle colture artificiali per lungo tempo, in condizioni favorevoli per parecchi mesi.

Attività biochimiche.

Il B. della difterite scinde il glicosio, il maltosio, la mannite, la glicerina e la destrina con produzione di soli acidi; non attacca mai il saccarosio. Del resto esso è capace di acidificare i sostrati nutritivi anche quando non contengono zuccheri: infatti in una coltura di 5 cmc. di brodo semplice, sviluppata a 37°, l'acidità dopo 20 ore corrisponde per lo più ad 1.2-1.5 cmc. di soluzione $N/40$ di $NaOH$, e dopo 40 ore a 2.5-3; in brodo glicosato ad 1 % l'acidità è sempre quasi doppia, così dopo 20 come dopo 40 ore. Il germe produce sempre indolo e poco idrogeno solforato; riduce anche lentamente i nitrati in nitriti. Talora dà colture pigmentate in giallo arancione.

Azione patogena.

Il B. della difterite agisce principalmente per mezzo del suo veleno. La virulenza delle colture di recente isolamento è variabilissima: in generale accade che da casi gravi si isolino stipiti assai virulenti, da casi lievi stipiti poco virulenti. Bisogna però ricordare che quasi sempre le brodocolture di 24 ore, inoculate sotto cute nella cavia in quantità di 0.2-0.5, al massimo 1.5 cmc., producono la morte dell'animale in brevissimo tempo. Degli stipiti virulenti basta inoculare sotto cute nella cavia 0.01-0.02 cmc. di brodocoltura per ottenerne la morte in 2-4 giorni.

Il giorno dopo l'iniezione l'animale mostrasi abbattuto, senza voglia di mangiare, col pelo arruffato ed il muso bluastro. Nel punto di inoculazione palpasi un'infiltrazione più o meno consistente.

Se l'animale tarda a morire oltre i 4-5 giorni, nel punto di inoculazione può manifestarsi una zona d'alopecia e di necrosi cutanea. Nelle cavie che sopravvivono fino alla terza o quarta settimana, si possono presentare, benchè raramente, dei fenomeni paralitici; questi compaiono invece con maggior frequenza nelle cavie inoculate con miscele non perfettamente neutre di tossina ed antitossina.

Alla sezione di una cavia morta in pochissimi giorni, si nota nel punto inoculato un essudato biancastro, circondato da edema gelatinoso emorragico. Nell'addome si trova, ma non sempre, un po' di essudato sieroso o siero-fibrinoso, le capsule surrenali intensamente iperemiche e cosparse di chiazze emorragiche, l'intestino tenue iperemico, il rene congesto, la milza per lo più inalterata. Costantemente nella pleura e spesso nel pericardio si nota un essudato sieroso.

Alla sezione delle cavie morte dopo qualche settimana, oltre alla alopecia, alla necrosi cutanea e ad un'infiltrazione sottocutanea quasi callosa nel punto inoculato, non si osservano in generale altre lesioni, salvo che la milza può talvolta presentare piccolissimi focolai necrotici, simili quasi a tubercoli.

Strofinando minime quantità di coltura sulla mucosa faringea leggermente scarificata delle scimmie, sulla mucosa faringea e laringea dei polli e dei piccioni, come anche sulla mucosa tracheale e congiuntivale del coniglio, si riesce a produrre delle membrane, come quelle che si osservano nell'uomo: ancor meglio si riesce all'effetto scarificando il materiale sulla mucosa vaginale delle cavie.

Veleni.

Il filtrato di una brodocoltura di B. della difterite è tossico, ed inoculato sotto cute in quantità variabili, per lo più fra 0.002 e 0.01, conduce a morte l'animale in 2-5 giorni coi sintomi e le note anatomiche caratteristiche della difterite sperimentale. Si è convenuto di chiamare dose tossica minima letale di veleno difterico la minima quantità di esso che, inoculata sotto la cute del torace di una cavia del peso di circa 250 gr., la conduce a morte dopo 4-5 giorni coi sintomi ed il reperto anatomico su detti.

La preparazione del veleno difterico si fa in diversi modi. Bisogna anzi tutto escludere dai liquidi di coltura ogni traccia di zuccheri, i quali venendo scissi acidificano il brodo e lo rendono poco propizio alla formazione di veleno. Inoltre bisogna avere l'avvertenza di porre il liquido nutritivo in matracci con ampio fondo piano, e di far sì che lo sviluppo avvenga rigoglioso in superficie. È anche utile fare sfiorare la superficie della coltura da una leggiera corrente di aria; a tale uopo si usano i matracci di Fernbach, che hanno il fondo piano e molto largo, e che nella parte panciuta portano una tubulatura, dalla quale si può fare una lieve aspirazione, mentre per il collo viene richiamata nuova aria, fatta prima gorgogliare in un matraccio contenente dell'acqua, per inumidirla.

Facendo uso del brodo Martin (v. p. 1257), si può fare a meno dell'espediente ricordato. Il massimo di tossicità viene raggiunto in capo ad una settimana: verso l'ottavo giorno è dunque bene filtrare le colture.

Circa la costituzione del veleno difterico v. pag. 1412 e seg.

Azione antigena.

La più importante azione antigena del B. difterico è quella della sua tossina, con la quale immunizzando il cavallo si ottiene il siero antidifterico, usato per la cura e la profilassi della malattia. Dell'antitossina difterica è stato parlato a pag. 1409 e seg. Qui ripetiamo che per i sieri antidifterici l'unità di misura dicesi unità immunizzante, ed è la più piccola quantità di siero capace di neutralizzare perfettamente 100 dosi minime letali di veleno; ed aggiungiamo che dicesi siero normale quello

che in un cmc. contiene una unità immunizzante. I sieri in commercio contengono di solito 250-500-750 unità immunizzanti in un cmc., quindi sono rispettivamente 250-500-750 volte più forti del siero normale.

Sul modo coi quale si studia in generale il potere neutralizzante dei sieri antitossici v. p. 1316.

Qui ricordiamo in aggiunta un recente metodo di Römer per il dosamento dei sieri antidifterici: con questo metodo si utilizza una medesima cavia per parecchi saggi insieme, fino a sei. Egli ha visto anzitutto che, in vece di fare inoculazioni sottocutanee di miscele di tossina ed antitossina, se ne possono fare inoculazioni intracutanee, ottenendo gli stessi effetti. Per dosare il potere antitossico di un siero bisogna servirsi naturalmente di un veleno ben noto, sopra tutto per ciò che riguarda il suo potere di combinarsi con l'antitossina: a tal uopo si determina del veleno scelto la dose che, mescolata con $^{1}/_{10}$ di unità immunizzante della antitossina campione fornita da Ehrlich, ed inoculata intracutaneamente, produce una leggiera necrosi fra il 3° e il 7° giorno. L'inoculazione intracutanea si fa sollevando in plica la pelle, infiggendo l'ago della siringa e spingendolo parallelamente alla superficie cutanea in modo che penetri pochi mm., sempre nello spessore della pelle.

Una volta determinata questa dose di veleno, si prendono di questo parecchie, supponiamo sei, parti eguali alla dose determinata; alle diverse parti si aggiunge il siero da titolare in quantità gradatamente crescenti: le miscele devono essere fatte in soluzione fisiologica e preparate in modo che le dette quantità di veleno ed antitossina si trovino in 0.1 cmc. di liquido. Le sei miscele si fanno stare un'ora a 37°, indi si fanno altrettante iniezioni intracutanee in una medesima cavia. Questa si tiene in osservazione per una settimana: generalmente in alcuni dei punti inoculati si formerà una zona di necrosi forte, in altri non si manifesterà neppure traccia d'infiltrazione. Si nota allora il punto in cui si è prodotta una necrosi leggiera: la quantità di siero che era contenuta nella miscela inoculata in questo punto corrisponderà precisamente a $^{1}/_{10}$ di unità immunizzante. Se il valore trovato fosse, per esempio, di cmc. 0.0002, diremmo che questa quantità del siero esaminato contiene $^{1}/_{10}$ di unità immunizzante, che quindi un cmc. di esso conterrà $1 : 0.0002 \times 10 = 500$ unità immunizzanti.

Immunizzando il cavallo non solo col veleno difterico ma anche coi corpi batterici, si ottiene un siero, oltre che antitossico, anche batteriotropo. Tale proprietà fu già riconosciuta da Bandi, ed è stata recentemente confermata da Lindemann.

Römer ha per altro osservato che anche il siero dei cavalli immunizzati col solo filtrato delle brodocolture ha proprietà batteriotrope; il che non fa meraviglia, pensando che nel filtrato, oltre ai prodotti tossici, possono trovarsi altre sostanze antigene, e fra queste i tropinogeni.

Il B. difterico ha anche potere agglutinogeno, il quale però non ha avuto fino ad ora alcuna importante applicazione pratica, neppure per differenziare il vero B. difterico dagli pseudodifterici.

Esso ha anche un potere lisinogeno e quindi si possono ottenere delle batteriolisine specifiche, le quali sono state proposte a scopo di diagnosi differenziale fra il B. difterico e i bacilli pseudodifterici.

Diagnosi batteriologica della difterite.

Per la raccolta del materiale v. p. 1259.

Il batuffolo si strofina più volte su siero di Löffler solidificato in provette o dentro scatole di Petri. La coltura o le colture fatte si pongono in termostato a 37°.

Il batuffolo si arrotola poi su due portoggetti, in modo che vi rimanga aderente del materiale; l'uno si colora col turchino di Löffler (v. p. 1231) e l'altro col metodo di Neisser (v. p. 1236): se vi è sufficiente materiale da fare un terzo preparato, questo si colora col metodo di Gram.

Dopo 6-8 ore si prendono le colture e se ne fanno dei preparati con gli stessi metodi: se il risultato è negativo, o se per ragioni estranee la osservazione non può esser fatta dopo 6-8 ore, la si fa o si ripete dopo 16-20 ore.

Se nei preparati fatti estemporaneamente si riconoscono parecchi gruppetti di bacilli di forma e con disposizione tipiche, si può formulare già subito una diagnosi di probabilità.

Per assicurarla bisogna però sempre attendere il risultato delle colture: se nei preparati fatti da queste dopo 8-12 ore si trovano accumoli tipici, come dianzi è stato detto, la diagnosi è praticamente sicura. L'esistenza di pochissimi bacilli isolati, che somigliano a quello difterico, non ha valore.

D'altra parte un responso negativo sarebbe concesso nel solo caso che non si veda neppure una forma sospetta, ma anche allora non ha valore assoluto.

Quindi bisogna attendere l'esito dell'esame ripetuto dopo 16-20 ore, che è destinato al responso definitivo. È ben vero che i bacilli pseudodifterici e quelli della xerosi potrebbero mentire il B. difterico; ma fra le 16 e le 20 ore i primi non mostrano la tipica disposizione dei veri bacilli difterici, e quelli della xerosi sono ancor poco cresciuti o già mostrano forti rigonfiamenti.

La diagnosi batteriologica a scopo clinico, dovendo essere sollecita quanto più è possibile, termina a questo punto. Ma può capitare il caso che la diagnosi batteriologica della difterite debba fornire l'indicazione precisa ad energiche misure profilattiche: in tal caso bisogna sempre procedere all'

Isolamento e identificazione.

Dalle colture ottenute in siero Löffler si fa l'isolamento col metodo delle piastre, e dalle colonie isolate si fanno trapianti in brodo semplice leggermente alcalino, in brodo glicosato 1 % e su siero Löffler a strisciamento; indi si fa la prova della virulenza e quella dell'acidità, e si possono aggiungere quella della precipitazione (Wassermann) e quella della batteriolisi *in vivo* (Cathoire, Cadiot e Henry).

1. Della brodocoltura di 24 ore s'inietta cmc. 1-1.5 sotto cute in una cavia, che si tiene in osservazione. Se il germe isolato è il vero B. difterico, si noteranno i sintomi già descritti; la morte avverrà in 2-3 giorni, ed il reperto anatomico sarà caratteristico.

2. Dopo 20 e dopo 40 ore si titola l'acidità della coltura fatta in brodo glicosato (5 cmc.): se questa corrisponde dopo 20 ore a circa 2.5-3, e dopo 40 ore a circa 5-6 cmc. di acido $N/_{10}$, ciò conferma la diagnosi di B. difterico.

3. Per eseguire la prova della precipitazione, che però secondo alcuni è incostante, bisogna avere pronto un siero antibatterico specifico, ed aggiungerlo nella proporzione di 1 : 50 all'autolizzato limpido di una agarcoltura del bacillo sospetto. Se si manifesta il fenomeno della precipitazione, che è sempre leggiero e consiste per lo più in un tenue intorbidamento, si ha una prova di più per asserire la diagnosi.

4. In una piccola cavia s'inocula sotto cute un cmc. di siero antibatterico: il giorno dopo s'inietta nel peritoneo un cmc. di soluzione fisiologica contenente un'ansa normale della patina cresciuta su siero. Mezz'ora dopo la seconda inoculazione si prelevano poche gocce dell'essudato peritoneale, e se ne fanno preparati a strisciamento. Se il germe assoggettato a questa prova è quello della difterite, nei preparati non si vedono per nulla elementi batterici integri; mentre se è un pseudodifterico, si vedono sempre parecchi corpi batterici ben conservati, sia liberi sia inclusi nei fagociti.

Questa prova di batteriolisi è più sicura, secondo i su nominati autori francesi, di quella della precipitazione.

Per differenziare il B. difterico dagli pseudodifterici e da quello della xerosi possono essere utilizzati i caratteri esposti nel seguente specchietto.

Specie	Accenno di ramificazioni in alcune colture	Granuli cromotropi	Acidità delle brodocolture glicosate dopo 40 ore	Azione patogena per la cavia
B. difterico. . . .	+	numerosi, polari	5.7-5.8	+
Bb. pseudodifterici	—	rari, irregolarmente disposti	1.3-3.2	—
B. della xerosi . .	—	id.	0.7-2.1	semplice infiltrazione sottocutanea; mai morte

Bacterium mallei

o *Corynebacterium mallei, B. della morva.*

Fu scoperto nel 1882 da Loeffler e Schütz. È causa della morva, e si trova soltanto negli animali morvosi: cavalli, asini, gatti, capre, pecore, raramente anche maiali.

Caratteri microscopici.

Bastoncini snelli, delle dimensioni di 0.5 $\times$ 2-3 μ, con estremità rotondeggianti o leggermente affilate, diritti, senza movimento di traslazione e senza ciglia, ma dotati di un più o meno vivace movimento molecolare, asporogeni, non sempre uniformemente colorabili, non resistenti al Gram. Spesso la colorazione è frammentaria; nelle forme corte si può notare una caratteristica colorazione bipolare; nelle forme lunghe, oltre ai poli, si osserva non di rado anche un tratto mediano colorato, che separa due spazi chiari.

Colorando questi germi col metodo di Neisser si rendono evidenti in parecchi individui granuli metacromatici.

Nelle vecchie colture s'incontrano forme clavate, filamenti e perfino accenni di ramificazioni.

Il B. della morva somiglia dunque moltissimo a quello della difterite.

Colture.

Questo germe cresce bene in tutti gli ordinari terreni di coltura, meglio nei glicerinati; è aerobio, ma stentatamente può anche nascere in ambiente con poco ossigeno; l'ottimo di temperatura è 37°, il minimo 22°-25°, il massimo 40°.

Colonie su agar. — Le superficiali sono rotonde, piccole, biancastre, semitrasparenti; a piccolo ingrandimento mostrano un contorno regolare o leggermente ondulato; colore grigio in principio e più tardi giallastro, specialmente nel centro; struttura finamente granulosa.

Le colonie profonde sono più piccole, più scure, più granulose, di forma ellittica o a cote.

Colonie in gelatina. — Le superficiali sono più piccole di quelle in agar, quasi puntiformi, e non ingrandiscono molto col tempo; al microscopio appaiono incolore o giallo-chiare, trasparenti, con margini lobati, con superficie ondulata e ricca di riflessi; è non di rado percorsa da fini solcature radiali, simili a quelle di una tipica colonia di B. del tifo. Le colonie profonde non hanno nulla di caratteristico, e somigliano a quelle in agar.

Coltura in brodo. — Intorbidamento lievissimo; discreto sedimento omogeneo che, agitando la provetta, si solleva a spirale, formando una specie di cavatappi; niente pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, liscia, umida, con margini regolari, senza caratteri speciali, somigliante ad una patina di *Bact. coli*, ma più sottile.

Infissione in gelatina. — Nastrino grigio, granuloso, continuo, oppure composto di una filza di piccole colonie. In superficie una colonia delicata, trasparente, grigia, opaca, sfrangiata.

Coltura in latte. — Il B. della morva si sviluppa nel latte, coagulandolo con lentezza.

Strisciamento su patata. — Patina poco rilevata, di aspetto untuoso, con margini non ben distinti. Il colore in principio è giallo-chiaro, poi diviene giallo-bruno, e ricorda quello della cioccolata; intanto i margini si fanno più precisi e ondulati, restando però sempre di colore più chiaro del resto della patina. La patata stessa col tempo imbrunisce.

Vitalità in coltura. — Le colture di questo germe si mantengono vitali per 3 o 4 settimane, ed in condizioni favorevoli anche per più mesi.

Attività biochimiche.

Il B. della morva produce poco indolo, non idrogeno solforato. Non produce mai gas in presenza di qualsiasi idrato di carbonio. Alcuni stipiti producono triptofane (Erdmann e Winternitz), altri no (Sampietro).

Azione patogena.

La virulenza del B. della morva si può conservare, benchè un po' attenuata, per più mesi in colture artificiali, purchè protette dalla luce, dall'essiccamento e dalle alte temperature.

Gli animali recettivi sono, oltre gli animali che possono ammalare spontaneamente, anche le cavie, gli spermofili ed alcune specie di *Arvicola*; poco recettivi sono i conigli, refrattari i topi domestici grigi e i ratti.

L'esperimento più importante che si suol fare sull'azione patogena del B. della morva consiste nell'inoculare circa 2 cmc. di sospensione di agarcoltura nel peritoneo di un caviotto, infiggendo l'ago nella linea mediana, poco al di sopra della vescica urinaria. Secondo il grado di virulenza della coltura, dopo 3-4 giorni si nota una tumefazione dello scroto, che è arrossato e dolente; la tumefazione va crescendo, mentre la pelle scrotale si fa sempre più tesa e lucente; dopo qualche giorno si può rompere in diversi punti, dai quali geme un essudato purulento tenace, viscoso. L'animale muore dopo 6-8-12 o pochi più giorni; alla sezione si nota che la tunica vaginale del testicolo è cosparsa di numerosi noduli biancogiallastri, e che i suoi due foglietti sono aderenti per

interposizione di essudato purulento; del resto noduli morvosi trovansi anche nella spessezza del parenchima dell'organo. Il B. specifico è dimostrabile nel pus e nei noduli.

Questa alterazione caratteristica, ed i segni esteriori che ne derivano e che sono osservabili *intra vitam*, vanno sotto il nome di *fenomeno di Strauss*.

Non è però a credere che si tratti di un fatto strettamente specifico, tale cioè che, già all'ispezione, possa essere dichiarato di natura morvosa. Abbiamo visto che una vaginalite purulenta può ottenersi anche inoculando il *M. melitensis* (v. p. 1459); e qui aggiungiamo che Baruchello potè riprodurla anche inoculando il *Bact. prodigiosum* Alla sezione si riscontrano senza dubbio differenze, perchè mancano in questi due casi i noduli nel parenchima: in ogni modo gli esami microscopico e colturale chiariranno ogni dubbio.

Veleni.

Dalle brodocolture del B. della morva si ottiene, col metodo stesso che serve a preparare la tubercolina antica (v. B. della tubercolosi), una sostanza tossica che dicesi « malleina » e che è adoperata a scopo diagnostico nei cavalli sospetti morvosi (v. più oltre).

Azione antigena.

Si possono dimostrare nel siero dei cavalli morvosi agglutinine specifiche, attive anche nel siero diluito 1 : 500-1 : 1000; nei cavalli sani vi sono agglutinine, ma in minore quantità, di guisa che il siero è attivo solo fino a diluzioni 1 : 200 1 : 300. Bonome ha messo in evidenza l'importanza diagnostica dell'agglutinazione specialmente nei casi di morva chiusa.

Reazioni anafilattiche a scopo diagnostico. — La malleina, che si prepara come la tubercolina, le somiglia anche per la sua proprietà di destare fenomeni acuti negli animali morvosi, non nei sani, allorchè viene inoculata in una determinata quantità.

La prova diagnostica si fa così. Dopo aver tenuto in osservazione termometrica l'animale per 3 giorni, prendendo e notando la temperatura ogni 4 ore, s'inocula sotto cute 2.5 cmc. di malleina allungata con una soluzione di acido fenico al 0.5 % fino al rapporto 1: 10. Si continua a prendere la temperatura, e si osserva se sopravvengono fenomeni generali e locali.

Gli animali che già 6-8 ore dopo l'iniezione presentano una elevazione termica, la quale superi di due gradi o più la media temperatura del periodo d'osservazione, si dichiarano sicuramente morvosi.

Quelli in cui l'inalzamento della temperatura è di 1.2°-1.9° restano semplicemente sospetti; quelli che presentano un aumento inferiore

ad 1.2° si dichiarano indenni. Nel punto d'iniezione, negli animali morvosi, formasi una tumefazione che dura parecchi giorni.

Questo metodo diagnostico è molto usato nella pratica, non ostante che in taluni casi i risultati che si ottengono possano perdere valore per circostanze diverse. Così, per esempio, è noto che l'esperimento fatto in animali cachettici non risponde con sicurezza; che talora in animali sani possono aversi aumenti di oltre 1.2°; che in animali malati al contrario la reazione febbrile può essere leggiera, quindi mendace.

Isolamento e identificazione.

Per isolare il B. della morva dall'animale si strofina nelle cavità nasali sospette un batuffolo d'ovatta sterilizzato (v. pag. 259), oppure si estirpa qualcuna delle ghiandole linfatiche paratracheali tumefatte, e si allestiscono colture su patate ed in agar glicerinato. Per isolarlo dall'uomo si preleva l'essudato delle ulcere morvose o il contenuto degli ascessi, e se ne fanno similmente colture su patate e in agar glicerinato.

Dopo 24-48 ore d'incubazione a 37° si osservano le colonie nate su agar, e se ne fanno dei preparati colorati col metodo di Gram, col metodo di Neisser, e con soluzione idroalcoolica di turchino di metilene; inoltre si fa un preparato a goccia pendente. Se dall'osservazione microscopica risultano i caratteri noti del B. della morva, si fa la pesca delle colonie e si trapiantano in tubi di agar o di brodo. Quando però col B. della morva si trovano insieme altri germi, può riuscire talora difficile il riconoscere le colonie del primo, che non sono gran che caratteristiche su agar: naturalmente si finisce con l'ottenere lo scopo, avendo la pazienza di fare molti saggi sulle colonie maggiormente sospette.

Dalle colture su patata il riconoscimento delle colonie morvose dopo alcuni giorni è più agevole, per il loro speciale colore di cioccolata chiara.

Una volta isolato il germe, l'identificazione è facile, tenendo conto di tutti i caratteri descritti.

Vi è un germe che somiglia microscopicamente a quello della morva, ed è il B. pseudomorvoso di Kutscher: si distingue tuttavia perchè resiste al metodo di Gram. Il B. pseudomorvoso dà anche il fenomeno di Strauss, ma risparmia in genere il parenchima ghiandolare; ben si differenzia nelle colture, perchè su patata dà colonie bianche ed asciutte, ed in gelatina cresce in modo simile al V. del colera.

Diagnosi batteriologica della morva. — Da quanto è stato detto risulta che per la diagnosi batteriologica della morva bisogna fare le seguenti ricerche:

1. Preparati microscopici, colorati con liquido di Loeffler e col metodo di Gram, del materiale prelevato;
2. Allestimento di colture in agar glicerinato e su patata;

3. Inoculazione di una certa quantità di materiale, sospeso in brodo, nel peritoneo (o, se vi sono commisti altri germi, oltre quelli presunti morvosi, sotto cute) di un caviotto;

4. Isolamento e identificazione delle colonie nate, ed inoculazione di 2-3 cmc. di una delle colture pure ottenute nel peritoneo di un caviotto.

Bacterium tuberculosis

o *Mycobacterium tuberculosis, B. tubercolare, B. di Koch.*

Fu scoperto da Koch nel 1884, come causa del mal perlaceo dei bovini, e poi come causa della tubercolosi umana. Più tardi fu riconosciuto anche causa della tubercolosi aviaria. Si distinguono quindi tre tipi: l'umano, il bovino, l'aviario o gallinaceo. Si trova in qualsiasi focolaio tubercolare dell'organismo, come anche nel latte di una parte delle mucche tubercolose. Pare che si trovi altresì nel muco nasale di medici ed infermieri sani che assistono i tubercolosi.

Nell'ambiente trovasi nei luoghi di dimora dei tubercolosi e sugli oggetti stati a contatto o in prossimità di essi.

Si conosce anche un tipo di B. tubercolare degli animali pecilotermi, come pesci, anfibi, rettili: di questo tipo non ci occuperemo.

Caratteri microscopici.

Bastoncini snelli, delle dimensioni di 0.4-0.5 × 1.5-4 μ, diritti o leggermente incurvati, con estremità affilate, immobili, senza ciglia, asporogeni, spesso uniformemente, talora interrottamente colorabili, isolati o riuniti a X o ad Y, oppure in mucchietti irregolari (v. tav. V, fig. 2), resistenti al Gram ed acidoresistenti. È da avvertire che in alcuni prodotti morbosi, specialmente caseificati, il B. tubercolare non si dimostra più acidoresistente: in tal caso, secondo Much, si può rendere evidente adoperando il metodo del Gram, in cui però la prima colorazione si faccia a freddo per 24 ore o a caldo fino all'ebollizione.

Coltivato su patata acida, il B. della tubercolosi può dare lunghi filamenti; in altre specie di colture, e pare anche nello sputo tubercolare, può dare forme con accenni di ramificazioni.

Il tipo bovino della tubercolosi suole presentarsi in forma di bastoncini più corti e più tozzi del tipo umano, il quale è rappresentato da elementi più lunghi e snelli. Il tipo aviario somiglia più all'umano.

Colture.

Il B. della tubercolosi cresce nelle colture d'isolamento, e nelle prime di trapianto, soltanto in terreni speciali contenenti sostanze proteiche, o almeno glicerinati al 5 % ; è assolutamente aerobio; predilige una rea-

zione neutra o leggermente acida. Il tipo umano e bovino hanno l'ottimo di temperatura a 37°, il minimo a 27°, il massimo a 41°; il tipo gallinaceo ha l'ottimo intorno a 40° e il massimo a 44-45°.

Si sviluppa con molta lentezza, tanto che non si hanno colture bene evidenti prima di 8-12 giorni; non cresce in gelatina. Il tipo umano dà in genere colture alquanto più rigogliose del tipo bovino, il tipo aviario più dell'umano.

Colture su agar glicerinato, a piatto o a strisciamento. — Si notano in principio piccole colonie irregolari, grumose, rilevate, opache, biancastre; via via che crescono, mostrano un contorno sempre maggiormente lobato e frastagliato ed una superficie verrucosa (v. fig. 524), e mentre la porzione centrale si fa più rilevata ed opaca, la parte marginale è sottile e quasi trasparente. Col tempo le colonie vicine espandendosi confluiscono, almeno in parte, e formano così una superficie rugosa variamente pieghettata, essendo spesso le pieghettature concorrenti in diversi punti rilevati, sicchè si ha l'aspetto di un insieme di montagne. Il colore delle colonie e della patina tende a poco a poco al giallastro; per alcuni stipiti è nettamente giallo arancione.

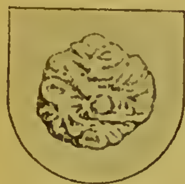


Fig. 524. — Colonia di B. tubercolare.

L'aspetto di tali colture suole essere più arido per il tipo bovino, meno per l'umano, umido per il tipo aviario.

Coltura su siero di sangue coagulato a becco di clarinetto. — Lo sviluppo avviene come su agar glicerinato, salvo che suole essere più rigoglioso.

Coltura in brodo glicerinato. — L'accrescimento avviene in superficie, sotto forma di coloniette separate, squammose, grigiastre, le quali ingrandendosi confluiscono, dando luogo ad una pellicola frastagliata, grumosa, variamente pieghettata, che risale alquanto sulle pareti del recipiente. Quando la pellicola è divenuta piuttosto spessa, cade in parte al fondo, mentre avviene in superficie una nuova moltiplicazione, destinata a ricostituire la prima pellicola disgregata e caduta.

Similmente può disgregarsi e cadere una parte della seconda pellicola, ed esser sostituita da una terza.

Per il tipo bovino la pellicola suole essere più arida e più sottile che per il tipo umano; per il tipo aviario suole essere più succolenta e rigogliosa.

Strisciamento su patata. — La coltura su patata si fa in tubi di Roux (v. p. 1249), contenenti nel serbatoio una soluzione acquosa di glicerina al 6 %: bisogna aver cura ogni giorno di bagnare la patata con tale soluzione, inclinando convenientemente il tubo.

Il germe si sviluppa in forma di piccole colonie, rilevate, grumose, opache, le quali col tempo confluiscono dando una patina umida con superficie verrucosa.

Sulla patata più che su altri terreni il B. della tubercolosi tende a produrre un bellissimo pigmento arancione.

Attività biochimiche

Il B. della tubercolosi non produce, in generale, indolo nè idrogeno solforato. Modifica la reazione dei terreni nutritivi: il tipo umano e il tipo bovino si comportano per questo rispetto in maniera differente, come è stato osservato da T. Smith.

Coltivando i due tipi bacillari in brodo glicerinato al 5 % ed acidificato tanto appena che la sua reazione corrisponda al 2 % di una soluzione normale di acido cloridrico, e facendo delle titolazioni sistematiche, si nota che durante le prime tre settimane l'acidità va a poco a poco diminuendo per tutti e due i tipi, fino a scomparire: dalla terza settimana in poi, mentre la reazione del tipo bovino diventa leggermente alcalina e tale si mantiene costantemente per alcune settimane ancora, quella del tipo umano ridiventa acida in misura sempre maggiore, fino a raggiungere un grado ancora più forte dell'iniziale.

Il tipo aviario si comporta come quello umano.

Azione patogena.

Il B. della tubercolosi è patogeno in alto grado per l'uomo, le scimmie, i bovini e per gli uccelli in genere, come polli, fagiani, pappagalli, ecc.; meno patogeno è per il maiale e per il cane: assai meno ancora per la pecora, la capra, il cavallo, il gatto. Fra i piccoli animali d'esperimento sono molto recettivi il coniglio e la cavia.

Vi sono alcune importanti differenze fra il tipo umano e il bovino rispetto all'azione patogena. Il primo, inoculato nel vitello, non produce mai una tubercolosi generalizzata, ma semplicemente una lesione locale nel punto d'iniezione: questa lesione resta circoscritta e, dopo un breve periodo progressivo, si riduce e scompare. Il tipo bovino invece produce sempre un'infezione che rapidamente invade gli organi interni.

Rispetto al coniglio il tipo bovino si dimostra assai più virulento del tipo umano: supponendo di avere due colture virulente, si ottiene un'infezione generalizzata e letale in 3 settimane col tipo bovino, inoculandolo nelle vene in dose di 1 mgr. di coltura; laddove inoculando la stessa quantità di coltura del tipo umano non si hanno che dopo alcuni mesi i sintomi di una tubercolosi cronica, localizzata nei reni, nei testicoli, nei polmoni, nelle articolazioni. Inoltre, inoculando sotto cute 1 cgr. di coltura del tipo bovino, si ottiene un'infezione generalizzata abbastanza rapida, ciò che non si ottiene inoculando sotto cute la stessa quantità di coltura del tipo umano.

Secondo Trommsdorff, una simile differenza mostrano i due tipi bacillari anche rispetto al topo.

Dagli studi di Jatta e Cosco risulta inoltre che nel gatto, nell'agnello ed anche nel maiale il tipo bovino produce una tubercolosi generalizzata, mentre il tipo umano o resta senza effetto o dà solo alterazioni limitate al punto d'inoculazione. Secondo gli stessi autori le galline sono refrattarie ed i cani molto resistenti verso tutt'e due i tipi.

La cavia è molto recettiva tanto verso il tipo umano, quanto verso il tipo bovino. Inoculando in essa sotto la cute della coscia una piccolissima quantità di coltura, si nota per lo più dopo 8 o 10 giorni un nodulo nel punto inoculato, che a poco a poco si rammollisce e si rompe all'esterno, dando luogo ad una vera ulcera tubercolare. Le ghiandole inguinali s'ingrossano sempre più. L'animale dimagra e muore dopo qualche mese. Secondo la dose inoculata e secondo la virulenza dello stipite, la morte può avvenire anche dopo due settimane, o soltanto dopo 4 o 5 mesi.

Alla sezione si vedono le ghiandole linfatiche del sottocutaneo ingrossate, in parte dure ed in parte rammollite, per l'esistenza di noduli giallastri. Nella cavità addominale si riconosce la milza enormemente ingrossata, piuttosto dura, con superficie granulosa, cosparsa di numerosi piccolissimi tubercoli grigi e di più grossi noduli giallastri caseificati, talora di irregolari masse caseose risultanti dalla confluenza di più noduli. L'omento suole essere ispessito e duro, non di rado anch'esso pieno di nodulini giallastri; esso aderisce a guisa di salsicciotto alla grande curvatura dello stomaco. Il fegato è anch'esso ingrossato, ma assai meno della milza, e raramente presenta tubercoli visibili ad occhio nudo. Le ghiandole prevertebrali, mesenteriche e retroperitoneali sono ingrossate e possono presentare dei nodulini giallastri.

Talora anche la sierosa viscerale e la parietale appaiono tempestate di minutissimi tubercoli grigi.

Nel torace si vedono tubercoli sulla pleura polmonare, talora anche sulla parietale. Le ghiandole peribronchiali e retrosternali sono ingrossate, cogli stessi caratteri di quelle della cavità addominale.

Il tipo che è causa della tubercolosi umana è con massima frequenza il tipo umano. Però in alcuni casi di affezioni tubercolari, sopra tutto delle ghiandole, nei bambini e nei giovinetti, è stato isolato il tipo bovino, che non è stato quasi mai isolato dai tubercolosi adulti (Kossel, Weber e Heuss, Commissione inglese). Secondo alcuni, le forme lupose negli adulti sarebbero prodotte sempre dal tipo bovino; ma Gosio in cinque casi di lupus ha isolato il tipo umano: quindi quell'affermazione non può avere carattere generale.

Il tipo aviario, che è causa frequentissima della tubercolosi dei volatili, è assai patogeno per il coniglio, poco per la cavia: in ogni caso manca la tubercolosi miliare generalizzata, mentre le ghiandole linfatiche sono caseificate, e la milza è ingrossata e con noduli caseificati anch'essa.

Veleni.

Dalle colture in brodo glicerinato si può estrarre un prodotto tossico che è la tubercolina. Secondo il metodo di Koch, si fanno delle colture in brodo glicerinato al 5%, che vengono tenute per 6-8 settimane a 38°, poi si sterilizzano in autoclave a 110°, e si riducono al decimo del loro volume, con lo svaporamento in bagnomaria.

Il liquido si filtra per candela di porcellana. Il preparato che si ottiene ha colore bruno, consistenza sciropposa, ed un debole odore di fiori: si chiama tubercolina grezza o bruta, oppure tubercolina antica. Da essa può ottenersi, mediante precipitazione con alcool, una sostanza biancastra, che, disseccata su acido solforico, costituisce il 10 % circa della tubercolina grezza. Per le sue reazioni chimiche essa avvicinasi al tipo delle albumose.

Un'altra specie di tubercolina estrasse Koch dai corpi bacillari triturati e trattati con *NaOH* N/10: il liquido filtrato per carta e neutralizzato porta il nome di tubercolina *A* o *TA*.

Un terzo metodo di estrazione adoperato da Koch è il seguente: i corpi batterici, liberati prima dalle sostanze grasse con alcool e con etere, si disseccano nel vuoto, poi si polverizzano in un mortaio di agata, aggiungendovi a poco a poco dell'acqua sterilizzata; la sospensione viene centrifugata per oltre mezz'ora, e dopo aver decantato il liquido e messolo da parte, il sedimento viene riessiccato e poi novamente sottoposto alla triturazione, allungato con acqua e centrifugato. Dopo la decantazione di questo secondo liquido, il sedimento è di nuovo assoggettato a sua volta alle medesime operazioni descritte. Queste si ripetono periodicamente tante volte finchè non rimane più quasi traccia di sedimento. Il primo liquido decantato si chiama tubercolina *O* o *TO*, la miscela delle successive frazioni è detta tubercolina *R* o *TR*; la prima non si altera con l'aggiunta del 50 % di glicerina, la seconda invece dà un precipitato bianco fioccoso.

La tubercolina antica, o grezza, la *TA* e la *TO* hanno essenzialmente proprietà tossiche, la *TR* anche e sopra tutto proprietà immunizzanti.

La tubercolina bruta, inoculata in dosi di 2 cmc. sotto cute nella cavia, di 5 cmc. nel coniglio, di 10 e più cmc. nel vitello, produce un po' di febbre e nient'altro. L'uomo invece è sensibilissimo: infatti inoculandogli sotto cute $^1/_4$ di cmc. di tubercolina si provocano fenomeni gravi, cioè febbre intorno a 39°, con brividi, vomito e diarrea; perfino inoculando $^1/_{100}$ di cmc. si ottiene una leggiera elevazione termica.

La tossicità della tubercolina è però grandissima per gli animali tubercolosi, e per l'uomo tubercoloso assai maggiore che per l'uomo sano. Uuna cavia infetta di tubercolosi da 5-6 settimane soccombe rapidamente all'iniezione sottocutanea di $^1/_2$ cmc. di tubercolina, presentando

prima un brusco aumento di temperatura, poi una graduale ipotermia e finalmente coma: alla sezione si nota in tutti i visceri una evidente congestione, che è particolarmente intensa nei focolai tubercolari, ed anche spesso chiazze di ecchimosi.

Nei bovini tubercolosi basta una dose di 0.3-0.4 cmc. per produrre un rapido e forte inalzamento di temperatura.

Nell'uomo tubercoloso dosi di 0.003-0.004 cmc. provocano un'elevazione termica a 41°, con brividi, vomito, tosse, itterizia; se vi sono lesioni cutanee, s'infiammano.

Carapelle ha ottenuto da colture del tipo bacillare dei pesci una tubercolina, meno tossica delle tubercoline del tipo umano, ma capace di destare utili reazioni nell'organismo.

Sono state fatte da Ruppel delle ricerche per vedere di che natura è la sostanza attiva esistente nella tubercolina che Koch ottenne estraendo con acqua i corpi bacillari precedentemente digrassati. Aggiungendo dell'acido acetico a questa tubercolina, si ottiene un precipitato piuttosto abbondante, insolubile in eccesso di acido, e contenente il 4 % di fosforo. Sbattendo il precipitato con acido solforico ad 1 %, ed aggiungendo alla soluzione ottenuta alcool assoluto, si ha un nuovo precipitato fioccoso, che, ridisciolto in acqua calda e trattato con acqua di barite, dà solfato di bario insolubile. Separando questo per filtrazione, ed aggiungendo alcool al filtrato, si precipita una sostanza che ha natura basica, è priva di fosforo, e delle reazioni proteiche dà soltanto quella del biurete. Il primo precipitato ottenuto con l'acido acetico, quello cioè che contiene il 4 % di fosforo, è una nucleina. La nucleina, per l'azione dell'acido solforico, rimane scomposta in acido nucleinico ed una sostanza proteica basica: questa viene precipitata dall'alcool, quello rimane nella soluzione acida; la prima, come abbiamo detto, è una sostanza basica, che somiglia alle protamine di Kossel, il secondo è un acido nucleinico, che contiene il 9.42 % di fosforo; la prima è stata chiamata tubercolosamina, il secondo acido tubercolinico. Tutt'e due trovansi uniti a formare la nucleina che fa parte del nucleoproteide disciolto nel liquido che ha nome di tubercolina, ed è verosimilmente quella stessa che De Giaxa estrasse con altro metodo dai bacilli tubercolari. Le proprietà tossiche specifiche della tubercolina spettano all'acido tubercolinico.

Oltre alla tubercolina di Koch, sono stati ottenuti con vari procedimenti altri svariatissimi prodotti tossici, dei quali sarebbe troppo lungo parlare: ricorderemo soltanto la tubercoloplasmina di Buchner, la tubercolocidina di Klebs, la tossina di Maragliano, i diversi tuberculoli di Landmann, che si usano principalmente a scopo diagnostico, e le diverse tulasi di Behring, fra cui la tulaselattina preparata a scopo curativo.

Diagnosi della tubercolosi per mezzo di reazioni anafilattiche. — Della proprietà che ha la tubercolina di provocare nell'organismo tubercoloso reazioni violente in dosi minime, tali che nell'organismo sano restano senza alcuno effetto, si trae profitto nella pratica per diagnosticare una



Fig. 1. — Bacillo difterico in coltura, colorato col metodo Neisser.



Fig. 2. — Bacillo tubercolare nello sputo, colorato col metodo Koch-Ehrlich.

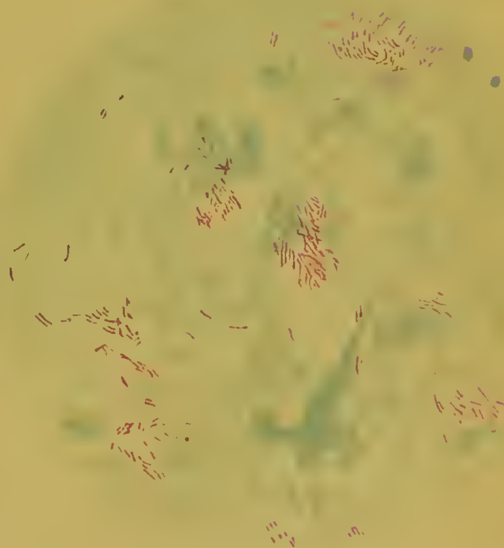


Fig. 3. — Bacillo della lepra nel secreto nasale, colorato col metodo Ziehl-Neelsen.

tubercolosi dubbia. Le forme dell'applicazione diagnostica della tubercolina sono diverse.

1° L'iniezione sottocutanea non si adopera nell'uomo, ma è largamente usata per rivelare la tubercolosi nei bovini. A tal uopo questi animali si lasciano riposare per uno o due giorni, durante i quali si prende la temperatura rettale tre o quattro volte, poi s'inoculano 3-4 cmc. di una diluzione 1 : 10 di tubercolina in acqua fenicata al 0.5 %. Fra le 12 e le 24 ore dopo l'iniezione si prende la temperatura ogni 3 ore. Se la differenza fra il massimo della temperatura osservata dopo il trattamento e la temperatura trovata prima di esso è di almeno 1.5°, l'animale si considera tubercoloso; se è compresa fra 0.8 e 1.4 l'animale è semplicemente sospetto e dopo un mese può essere assoggettato ad una seconda prova; se la differenza è inferiore a 0.8 l'animale si ritiene sano.

2° L'inoculazione cutanea si adopera sopra tutto nell'uomo. Sulla cute della faccia volare dell'avambraccio si pone una goccia di una diluzione al 25 % di tubercolina bruta in acqua fenicata al 0.5 %, ed a qualche cm. di distanza una goccia di una miscela di glicerina al 50 % e di acido fenico al 0.5 % fatta nel rapporto di 1 : 3; con un vaccinostilo si lede superficialmente la cute nel mezzo della goccia di controllo, poi si fa altrettanto nella goccia di tubercolina, e si attende che le gocce siano prosciugate. Non vi è bisogno di fasciature. Se l'organismo è tubercoloso, nel punto tubercolinizzato si forma dopo 16-24 ore una papuletta rossa, che si va facendo sempre più rilevata e più ampia, ed intorno alla quale non manca mai un alone d'iperemia: nel punto scarificato per controllo non si vede alcuna reazione. Il fenomeno tocca il suo massimo in genere fra le 24 e le 48 ore, poi scompare verso il 4°-5° giorno, talora soltanto dopo una settimana e più. Questa reazione va col nome di von Pirquet, che l'ha osservata per primo, e dicesi anche cutireazione. Alcune volte essa riesce negativa in persone sicuramente tubercolose; inoltre negli adulti riesce positiva anche quando non vi sia tubercolosi in atto, ed allora essa indica probabilmente la preesistenza di focolai tubercolari guariti. Da ciò si comprende che il valutare i risultati della cutireazione può essere in alcuni casi difficile: tuttavia, secondo le accuratissime ricerche di Luzzatti, è ancora la più sicura fra le reazioni diagnostiche della tubercolosi, almeno nei bambini.

Assai meno sicura sembra essere tale reazione nei bovini.

3° L'instillazione nel sacco congiuntivale fu introdotta da Calmette. Si adopera la tubercolina bruta diluita nel rapporto di 1 : 100, e se ne instilla una goccia nell'angolo oculare interno, tenendo per un minuto divaricate le palpebre. Dopo 6-24 ore, se si tratta di un caso di tubercolosi, la congiuntiva palpebrale si mostra iperemica più o meno intensamente, tumefatta, specie verso la caruncola; talora l'iniezione vasale e l'iperemia diffusa si estende alla metà inferiore della congiuntiva bulbare, nel qual caso notasi anche una modica iperplasia follicolare, e si raccoglie nel fornice uno scarso essudato muco-fibrinoso : vi è

sempre un vario grado di lacrimazione. Tali fenomeni si dileguano, se sono leggieri, dopo 2-3 giorni; se intensi, dopo una settimana o più.

Questa reazione, che dicesi anche oftalmoreazione, è anch'essa malsicura, e va proscritta sempre che la congiuntiva sia anche leggermente malata o presenti segni di pregresse malattie.

Essa è stata adoprata anche nei bovini, e pare che possa riuscire positiva pur quando l'iniezione sottocutanea sia fallita per effetto di una reazione tubercolinica già precedentemente provocata, 2-4 settimane avanti.

Altri metodi d'applicazione permettono di osservare una reazione percutanea, (applicazione di una pomata di tubercolina al 50 %, secondo Moro), una reazione intradermica, ed una così detta auricoloreazione, introdotta da Tedeschi, per ottenere la quale si fa l'iniezione fra la pelle e la cartilagine della faccia esterna del padiglione dell'orecchio.

Lo spazio non consente di entrare nei particolari di questi metodi.

Azione antigena.

L'immunizzazione degli animali verso il B. della tubercolosi è difficile. Abbiamo visto che fra le varie tubercoline di Koch soltanto la *TR* è dotata di proprietà immunizzante; però l'immunità acquistata dagli animali è debole, nè maggiore è quella che altri autori hanno ottenuto inoculando colture del tipo aviario, attenuate col calore o filtrate, nel coniglio.

Vaccinazione dei bovini secondo Behring. — Assai più importanti sono l'esperienze fatte da Behring sulla vaccinazione dei bovini. Abbiamo già visto che il tipo umano è pochissimo virulento per questi animali: orbene Behring riconobbe che i vitelli inoculati con colture del tipo umano diventavano immuni ad una consecutiva infezione fatta col tipo bovino. Questo metodo di vaccinazione antitubercolare fu introdotto nella pratica, e si applica nel seguente modo. In primo tempo s'inoculano nelle vene 4 mgr. di una patina batterica secca del tipo umano: il materiale va polverizzato nel mortaio e sospeso in soluzione fisiologica. Dopo un mese si fa una seconda iniezione di 20 mgr.

Sieri antitubercolari. — Il metodo di Behring rappresenta un'applicazione pratica diretta dei principî d'immunizzazione. Ma si sono anche immunizzati degli animali allo scopo di ottenere sieri terapeutici; se non che tutti quelli fino ad ora prodotti, come quelli di Marmorek, di Maragliano e di altri, non hanno pur troppo dimostrato alcuna azione durevolmente efficace sull'infezione tubercolare avanzata nell'uomo, se anche ne hanno alcuna nei casi incipienti e nell'esperimento sugli animali. Del resto Maffucci e Di Vestea hanno dimostrato che i veleni tubercolari non inducono modificazioni rilevanti nel siero degli animali immunizzati.

Cura tubercolinica. — Ultimamente, dopo gli studi di Wright sulle opsonine specifiche, si è ritornati, con opportune modificazioni, al metodo di cura specifica che Koch ebbe appunto in animo allorchè preparò la sua prima tubercolina. Inoculando questo prodotto in dosi minime in principio, più forti da ultimo, e regolando gli intervalli fra due iniezioni consecutive sulla guida delle variazioni del potere opsonico del siero sistematicamente saggiato, si cerca di promuovere nell'organismo una reazione utile. Invece della tubercolina bruta si adopera a tale scopo più spesso la nuova tubercolina di Koch, *TB*, che è una polvere di corpi batterici triturati, e la cui sospensione in soluzione fisiologica ha il vantaggio di provocare altresì la formazione di agglutinine specifiche, la cui ricerca può fornire un criterio approssimativo sull'intensità delle reazioni organiche utili.

Parecchi altri preparati sono stati recentemente introdotti nella pratica allo stesso scopo: ma tutti sono prodotti del B. tubercolare, ottenuti con diversi procedimenti.

Agglutinazione. — Le agglutinine del resto si trovano anche nel siero dei malati non trattati con la tubercolina; e la loro dimostrazione è stata proposta e adoperata a scopo diagnostico.

Per eseguire la reazione bisogna adoperare colture omogenee, quali si ottengono secondo Arloing e Courmont seminando il germe in palloncini a fondo piano, contenenti brodo glicerinato, e scotendole frequentemente durante l'incubazione, che deve essere di 10 giorni a 38°.

La tecnica della reazione è la solita: l'osservazione deve essere ripetuta più volte nelle 24 ore. Il siero dei tubercolosi agglutina i bacilli di Koch in diluzione di 1 : 5- 1 : 20, raramente in diluzioni maggiori. Ma la reazione non è costante, e d'altra parte è stata osservata pure con sieri normali.

Un metodo di agglutinazione più recente è quello di Koch. Si adopera la nuova tubercolina invece della cultura omogenea: si tritura e si sospende, nel rapporto 1 : 100, in soluzione fisiologica contenente 0.5 % di acido fenico; la sospensione si centrifuga e il liquido decantato si allunga ancora 10 volte.

Questa emulsione si conserva bene in ghiacciaia per due settimane: al momento del bisogno si allunga altre 10 volte, ottenendo così una diluzione 1 : 10000, che si adopera per la reazione. Ma i risultati che si ottengono con questo metodo non sono gran che superiori a quelli del metodo di Arloing e Courmont.

Fissazione del complemento. — Anche la reazione di Bordet e Gengou è stata adoperata per la diagnosi di tubercolosi, ma con risultati incostanti. Dal lato scientifico essa ha però la sua importanza, perchè dimostra un'altra forma di potere antigeno, oltre all'agglutinogeno, nel B. della tubercolosi.

Diagnosi batterioscopica.

In parecchi casi può farsi la diagnosi etiologica di tubercolosi per mezzo del solo esame microscopico: così nei casi di essudato pleurico, liquido cerebrospinale, ghiandole linfatiche, urina, latte, ecc.

Per dimostrare il B. della tubercolosi nei liquidi pleurico e cerebrospinale e nell'urina, bisogna centrifugarli prima, e fare i preparati col sedimento.

Per la dimostrazione del B. tubercolare nel latte, si adopera il metodo di Ilkewitsch (v. p. 837).

Ma il caso più frequente in cui occorre fare la diagnosi batterioscopica di tubercolosi è quello dello sputo, per cui vi sono diversi metodi.

Metodo ordinario. — Una particella piuttosto grossa di sputo, scelta fra i grumetti giallognoli, se ve ne sono, si pone, per mezzo di un'ansa di platino, sopra un portoggetti: con un altro portoggetti sovrapposto si comprime la massettina, facendo combaciare i due vetrini, e poi strisciandoli in senso opposto. Ciascun preparato si colora col metodo Ziehl-Neelsen o con altro metodo speciale per dimostrare l'acidoresistenza. L'osservazione microscopica dev'essere prolungata molto, quando occorre, perchè i bacilli tubercolari possono trovarsi in numero piccolissimo. Del resto, vi sono oramai parecchi metodi per rendere più agevole tale ricerca nei casi di reperto bacillare scarsissimo.

Metodo di Biedert. — 15-20 cmc. di sputo si allungano col doppio volume di acqua, e vi si aggiungono XV-XX o poche più gocce di liscivia sodica. Il miscuglio si fa bollire in una capsula di porcellana, finchè non diviene omogeneo: vi si aggiunge allora altrettanto volume di acqua, e si fa ribollire per qualche minuto. Si centrifuga infine, e, decantato il liquido, si allestiscono i preparati dal sedimento.

Altri metodi vi sono, simili a questo di Biedert, desunti cioè dal concetto di rendere omogeneo lo sputo con l'aggiunta di alcali.

Metodo di Lange e Nitsche. — Lo sputo reso omogeneo con liscivia potassica si sbatte ben bene con alcuni cmc. di ligroina: questa è un prodotto della distillazione del petrolio, con peso specifico di 0.68-0.72. Si attende fino a che i due liquidi si siano separati perfettamente, e si preleva il materiale per fare i preparati dallo strato di contatto dei due liquidi, nel quale si trovano raccolti tutti i bacilli tubercolari dello sputo, essendovi stati trascinati dalle goccioline della ligroina.

Metodo dell'antiformina o di Uhlenhut, Xylander e Kersten. - 40-60 cmc. di sputo o di altro prodotto morboso, nel quale i bacilli tubercolari si trovino in numero presumibilmente scarsissimo, oppure commisti con altri germi, si mescolano con 6-9 cmc. di antiformina: questa è composta di parti eguali di acqua di Javelle (ipoclorito sodico) al 10 % e di liscivia potassica al 10 %. Il miscuglio di sputo ed antiformina si fa a poco

a poco omogeneo, il che si agevola tenendolo alcune ore a 37°, poi si centrifuga, occorrendo si lava due volte il sedimento con soluzione fisiologica, e se ne allestiscono i preparati.

Il metodo dell'antiformina può combinarsi utilmente con quello della ligroina, sbattendo con la seconda sostanza lo sputo già reso omogeneo, mediante l'aggiunta della prima, non però centrifugato.

Isolamento.

L'isolamento del B. della tubercolosi è in generale difficile, specialmente quando esso trovasi commisto con altri germi.

Si ricorre ad espedienti diversi, secondo la natura del materiale; ed il più delle volte è necessario o conveniente fare prima l'inoculazione in animali recettivi.

Isolamento da materiali contenenti il solo B. della tubercolosi. — In alcuni organi interni, come la milza, le ghiandole linfatiche, il fegato, il rene, ecc., quali possono aversi dal cadavere umano o degli animali, sezionati non molto tempo dopo la morte, il germe può trovarsi in coltura pura: così pure in quei focolai tubercolari che nei malati sono accessibili agli strumenti chirurgici, p. es. ghiandole linfatiche del collo che non hanno ancora ulcerato la pelle, essudati pleurici, peritoneali ed articolari, focolai ossei, ecc. In tali casi l'isolamento del B. della tubercolosi può essere fatto direttamente nei terreni di coltura adatti. Questi possono essere il terreno di Hesse (v. pag. 1258), il terreno di Lubenau (v. pag. 1258), oppure il siero di sangue solidificato contenente il 4 % di glicerina. Il materiale, se è liquido, dev'essere prima centrifugato; se è solido dev'essere triturato in mortaio sterile ed allungato alquanto con brodo glicerinato. Il sedimento dei liquidi centrifugati o la poltiglia dei tessuti triturati vengono strisciati alla superficie dei terreni di coltura: bisogna sempre seminarne molti, e possibilmente di diversa composizione. Le provette seminate vengono coperte con cappucci di gomma sterilizzati, allo scopo di mantenere nell'interno il grado iniziale di umidità, e si pongono a sviluppare alla temperatura di 38° C.

Nel caso che siansi adoperate scatole di Petri con terreno di Hesse, queste vanno rinchiuse in una camera umida sterilizzata (v. pag. 1242), col fondo coperto da carta bibula umettata con acqua sterile, sempre allo scopo di mantenere un conveniente grado di umidità. Il B. della tubercolosi, se nasce, non dà colture bene evidenti prima di una dozzina di giorni; in ogni caso bisogna aspettarsi che parecchie provette rimangano sterili.

È però da avvertire che specialmente il tipo umano cresce male allorchè è isolato direttamente nei terreni di coltura: quindi, oltre agli isolamenti, non bisogna mai trascurare l'inoculazione di un po' di materiale nella cavia, per poi coltivare il germe dagli organi di essa quando

è morta; senza attenderne la morte, si può sacrificare dopo tre o quattro settimane.

Isolamento da materiali contenenti altri germi. — È questo il caso dello sputo tubercolare, del pus proveniente da focolai aperti del tessuto polmonare, ed in genere di qualsiasi organo di cadaveri la cui sezione è stata molto ritardata; lo stesso vale per il latte di mucche tubercolose.

Per ciò che riguarda lo sputo, si è tentato anche di isolarne il germe direttamente. Secondo Spengler si distendono 3 cmc. di escreato sul fondo di una scatola Petri e vi si aggiunge del succo pancreatico: il coperchio della scatola si riveste internamente di carta bibula inumidita con 3-5 cmc. di formalina. Dopo due ore di permanenza a 25°, tutti i germi sarebbero già morti, salvo il B. della tubercolosi: allora si semina lo sputo in molti tubi di agar glicerinato, e per il resto si procede come è stato detto poco avanti.

Secondo Piatkowski un po' di sputo si emulsiona in 10 cmc. di acqua sterile, e vi si aggiungono due o tre gocce di formalina: dopo mezz'ora, e successivamente ogni 15 minuti, si allestiscono parecchie colture in agar glicerinato.

Opportunamente Uhlenhut, Xylander e Kersten hanno proposto anche per la coltivazione dello sputo il metodo dell'antiformina, che già abbiamo indicato e descritto, per agevolare la dimostrazione microscopica dei bacilli. A tal uopo 10 cmc. di sputo si mescolano con 10 cmc. di una soluzione di antiformina al 20 %, il miscuglio si rende omogeneo agitandolo per una o due ore con una bacchetta di vetro. Si centrifuga poi per mezz'ora o un'ora, si decanta il liquido soprastante e si lava il sedimento due volte con soluzione fisiologica: dopo l'ultima decantazione, il sedimento vien seminato in 6-8 tubi di siero bovino glicerinato o di patate glicerinate, strisciando alla superficie di ciascun terreno 4 o 5 ansate. La chiusura dei tubi si fa con paraffina.

Questo metodo di Uhlenhut può servire anche ad isolare direttamente il B. della tubercolosi da altri materiali inquinati.

Anche qui dobbiamo ripetere che non bisogna soltanto accontentarsi dell'isolamento diretto, ma fare altresì le iniezioni nella cavia, i cui organi poi saranno a suo tempo adoperati per le colture artificiali.

Per eliminare tutti gli altri germi dal materiale che devesi inoculare, conviene anche adoperare il processo dell'antiformina, ed inoculare il sedimento ottenutone.

Identificazione.

L'identificazione del B. della tubercolosi, isolato in coltura pura, va fatta, sia per ciò che riguarda i suoi diversi tipi, sia rispetto ai bacilli paratubercolari.

La distinzione fra tipo umano e bovino si fa principalmente per il loro diverso comportamento nel coniglio, nel topo e nel vitello, ed anche col saggio sistematico dei mutamenti di reazione delle colture in brodo glicerinato.

Quanto ai così detti bacilli paratubercolari, ricordiamo i seguenti:

1. *Mycobacterium smegmatis;*
2. *Mycobacterium phlei;*
3. *Mycobacterium lacticola.*

Tutti e tre questi germi, oltre che resistere al metodo del Gram, sono anche acidoresistenti; quindi la loro distinzione microscopica dal B. della tubercolosi può riuscire malsicura.

Il B. dello smegma può dare origine ad errori diagnostici quando si tratta di ricercare se con l'urina venga eliminato il bacillo della tubercolosi. Microscopicamente si può distinguere, secondo alcuni, col procedimento di Honsell: colorazione con liquido di Ziehl, decolorazione per 10 minuti con alcool a 96° contenente il 3 % di acido cloridrico, seconda colorazione con turchino di metilene allungato al doppio. Mentre nei preparati così fatti il B. della tubercolosi conserva la colorazione rossa, quello dello smegma invece si mostra colorato in turchino.

Ma non bisogna star contenti al reperto microscopico: la diagnosi è sicura soltanto quando l'inoculazione del materiale nel peritoneo della cavia resta senza alcun effetto patogeno.

Il B. dello smegma, secondo Fränkel, non è coltivabile; Laser e Czaplewski, e Weber, asseriscono però di averne ottenute culture pure, con caratteri simili a quelle del B. della xerosi (v. pag. 1542).

Il *Mycobacterium phlei* o B. di Moeller, che si trova su alcune erbe, è rappresentato da bastoncini in genere tozzi, che crescono in terreni comuni, piuttosto rapidamente, dando colture rigogliose. Nei terreni solidi si sviluppano colonie o patine, che nella parte centrale o rispettivamente mediana sono spesse, opache, di aspetto grasso, con superficie rugosa o pieghettata, e nella parte periferica sono sottili, grigiastre, semitrasparenti, con margini dentellati o sfrangiati. Nei terreni liquidi spesso manca l'intorbidamento, talora si forma una sottile pellicola, sempre un sedimento non abbondante che, scotendo il liquido, si solleva in massa raccolta a lucignolo.

Le colture sono sempre di colore arancione. Il germe cresce in gelatina senza fluidificarla, dà poco indolo, non idrogeno solforato.

Il *Mycobacterium lacticola* dà bastoncini diritti o incurvati, talora piegati ad angolo, spesso clavati. Si sviluppa abbastanza rapidamente e cresce in tutti i terreni di coltura, compresa la gelatina. Dà colonie e pàtine simili in principio a quelle del *Bacterium coli*, ma dopo alcun tempo si pieghettano debolmente e si pigmentano di giallo arancione, con pendenza al rosso rame. Intorbida i sostrati liquidi.

A differenza del *M. phlei*, il *M. lacticola*, inoculato sotto cute nella cavia, produce un ascesso, che dopo circa dodici giorni si rompe all'esterno e guarisce.

Sacrificando l'animale dopo due o tre settimane si osservano noduli sporadici nelle ghiandole linfatiche ed in alcuni organi interni, specie nel fegato. Tali noduli sono più numerosi e diffusi quando si fa l'inoculazione endoperitoneale.

La cavia però non muore mai spontaneamente per il processo morboso; i bacilli inoculati non si moltiplicano; i noduli reiniettati in altre cavie non producono più alcuna lesione.

Se insieme con una coltura del germe s'iniettano nel peritoneo anche 4·5 cmc. di burro fuso, allora soltanto si ottiene la morte dell'animale in pochi giorni, ed alla sezione gli organi addominali sono avvolti da spessi coltroni fibrinosi, infarciti di bacilli.

Bacterium leprae

o *B. della lebbra.*

Fu scoperto da Hansen nel 1877; fu poco dopo studiato anche da Neisser.

È causa della lepra, in tutte le sue forme.

Caratteri microscopici.

È un germe similissimo a quello della tubercolosi, dal quale non può essere facilmente differenziato neppure per il comportamento rispetto ai vari metodi di colorazione (v. Tav. V, fig. 3). Ricordiamo tuttavia che, secondo alcuni, mentre il bacillo della lepra si colora bene in 6-7 minuti con una soluzione acquosa di fucsina, in modo che il consecutivo lavaggio in acqua lo lascia di color rosso vivo, il B. della tubercolosi dopo siffatta operazione resta molto sbiadito; rispetto al turchino di Loeffler i due germi si comportano in modo inverso, cioè il B. della lepra si colora più debolmente del B. della tubercolosi.

Nei prodotti morbosi e nei tessuti dell'organismo il B. della lepra si distingue da quello della tubercolosi per la sua straordinaria abbondanza, per il suo frequente aggruppamento a fascetti di sigari e per la sua frequente posizione intracellulare.

Colture.

Dopo molti infruttuosi tentativi, o meglio dopo molte asserzioni controverse, si può oramai dire che è coltivabile il B. della lepra in agar con siero glicerinato, in agar glicerinato, su patata glicerinata. Le con-

dizioni di sviluppo e l'aspetto delle colture che si ottengono somigliano, secondo alcuni, a quelle del B. della tubercolosi ed in parte a quelli del B. difterico, secondo Bordoni-Uffreduzzi, Gianturco ed altri.

Secondo Campana però il B. della lepra cresce bene solo in terreni solidi, specialmente su agar glicosato, ed in anaerobiosi. Seminando il materiale per infissione, e ponendo la coltura allestita alla temperatura di 37-40°, lo sviluppo si manifesta soltanto fra il settimo e il nono giorno, sotto forma di un intorbidamento lineare, lungo la metà o i due terzi inferiori della linea d'infissione. Dopo 2-3 giorni si può riconoscere che lo sviluppo risulta composto di piccole colonie addensate e sovrapposte. Facendo colture per agitazione, le colonie si presentano sparse nel cilindro nutritivo, mancano però sempre nel tratto superiore di questo. Ducrey, Stanziale ed altri hanno confermato i risultati delle ricerche di Campana.

Azione patogena.

Sono state fatte esperienze d'infezione con colture pure negli animali; però non si è potuto ancora ottenere alcuna delle tipiche lesioni che si osservano nell'uomo. Buona parte degli autori concordano nell'asserire che i bacilli inoculati periscono rapidamente negli animali d'esperimento, confermando le esperienze di Campana. Questi riconobbe infatti che la lepra non è trasmissibile ai cani, ai polli, ai conigli, alle pecore, ai maiali, alle scimmie, ed interpretò i risultati positivi asseriti da altri come dovuti a semplici reazioni infiammatorie, senza alcun carattere specifico.

Tuttavia tanto Serra quanto Stanziale, inoculando nella camera anteriore dell'occhio del coniglio frammenti di noduli leprosi, riuscirono a riprodurre una lesione nodulare, a lenta evoluzione e con tutti i caratteri istologici e batterioscopici propri delle neoformazioni lepromatose. Serra ottenne lo stesso risultato anche inoculando i bacilli isolati in coltura pura; e convalidò la natura leprosa della lesione dimostrando nel siero dei conigli inoculati la comparsa di sostanze fissatrici del complemento specifiche, cioè attive solo in presenza di antigeni leprosi, non di antigeni tubercolari.

Azione antigena.

Il B. della lepra eccita nell'uomo malato la produzione di anticorpi specifici. Fra questi ricordiamo anzi tutto le agglutinine, perchè di esse alcuni autori si sono avvalsi per accertare che il germe isolato in colture artificiali era veramente quello della lepra. Si aggiungano anche le sostanze fissatrici del complemento specifiche (Serra), che naturalmente non vanno confuse con quelle non specifiche le quali danno la reazione di Wassermann: infatti è noto che molti sieri di leprosi dànno questa reazione positiva.

Bacterium ulceris cancrosi
o *B. dell'ulcera molle.*

Fu scoperto da Ducrey nel 1889 nel pus delle ulcere, e poi trovato da Unna nelle sezioni istologiche di esse.

Si trova soltanto in questa affezione.

Caratteri microscopici.

Nell'essudato dell'ulcera molle si vedono in numero variabile bastoncini delle dimensioni di 0. 5-0. 8 × 1. 5-2, 5 μ, per lo più riuniti in lunghe catene, che talora abbondano nelle lacune linfatiche del tessuto malato. Per le lunghe catene che esso forma, fu già denominato streptobacillo da Colombini. Dalle patine su agar con sangue si ottengono per lo più bastoncini isolati, dall'acqua di condensazione spesso catenelle. I germi sono immobili, senza ciglia, asporogeni, ben colorabili coi colori basici, non però col metodo di Gram: presentano spesso una colorazione bipolare. Secondo Serra, sono talora aggruppati, nelle colture, a palizzata; dalle colture su agar con sangue di coniglio si ottengono forme clavate, per le quali il germe deve ascriversi al genere *Corynebacterium* di Lehmann e Neumann.

Colture.

Non sempre si riesce a coltivare questo germe. Il terreno da scegliere è l'agar mescolato con sangue nella proporzione di tre parti ad una. Per raccogliere il materiale, si disinfetta l'ulcera, poi vi si pennella sopra un po' di collodio jodoformico: il pus che si raccoglie sotto la pellicola vien seminato. Oppure si escide l'ulcera (se è sul prepuzio), si sciacqua 6-8 volte in soluzione fisiologica riscaldata a 37°, e col materiale così deterso si allestiscono le colture. Le colonie, che si sviluppano dopo 48 ore, sono prima rilevate a calotta e grige, poi si spianano e si fanno più chiare. Si possono facilmente sollevare con un ago di platino, ma difficilmente si lasciano disgregare.

Dalle ricerche di Serra risulta che, come i caratteri microscopici, così anche le colture, cioè le colonie che si sviluppano su agar e su gelatina, la patina su agar a strisciamento, l'infissione in gelatina, la brodocoltura, ricordano più o meno da vicino i caratteri dei *Corynebacteria*, cui appartiene il B. difterico.

Azione patogena.

Inoculando nell'uomo per scarificazioni colture pure del B. di Ducrey, si è potuta riprodurre l'ulcera molle tipica, e, come complicazione, la suppurazione delle ghiandole inguinali. Esperienze consimili hanno avuto esito positivo anche nelle scimmie.

Il germe non è patogeno per le cavie, per i conigli, per i topi bianchi, per i ratti, per i cani, per i gatti, qualunque sia la via d'inoculazione: neppure inoculato per scarificazioni sulla mucosa genitale di cani, gatti, cavie, conigli produce alcuna lesione (Serra).

Bacterium erysipelatos suis

o *Bact. rhusiopathiae, B. del mal rossino.*

Fu scoperto da Pasteur e da Thuillier nel 1883, e poco dopo, indipendentemente da essi, da Löffler e Schütz. Si trova nel sangue e negli organi dei maiali malati o morti di mal rossino; qualche volta è stato trovato nelle acque sporche ed in materie putrescenti.

Caratteri microscopici,

Bastoncini snelli, delle dimensioni di 0.4-0.5 × 2-4 μ, diritti o variamente incurvati, in modo da somigliare talora a vibrioni o spirilli, immobili, senza ciglia, asporogeni ben colorabili, anche col metodo del Gram.

Nell'organismo sogliono essere più piccoli e sempre diritti, conservando però la loro snellezza, sono isolati o riuniti a due o in piccoli accumuli, e si trovano spesso inclusi nel plotoplasma dei leucociti: nelle colture, specialmente liquide, si vedono spesso lunghe catenelle.

Colture.

Cresce nei comuni terreni di coltura, fra 15° e 40°, con l'ottimo a 37°; è aerobio quasi stretto; tutte le colture hanno aspetto delicatissimo.

Colonie in agar. — Sono piccole, quasi puntiformi, tenuissime, e talora non si vedono bene altro che contrapponendo alla piastra un fondo scuro. A piccolo ingrandimento appaiono piane, sottili, trasparenti quasi come velo, grige e omogenee in principio, più tardi alquanto giallognole e granulose. Le colonie profonde hanno forma ellittica, colore giallo bruno, margini lisci o granulosi.

Colonie in gelatina. — Le superficiali somigliano a quelle in agar ad occhio nudo; solo dopo alcuni giorni sembrano alquanto approfondate nel terreno, senza che questo mostri alcun accenno di fluidificazione. A piccolo ingrandimento presentano una parte centrale di color giallo chiaro, che talora ha aspetto omogeneo, ma più spesso è costituita come da un fitto groviglio di tenui filamenti tortuosi, che rende quasi l'immagine della tessitura di un nido; dalla parte centrale s'irradiano eleganti propaggini sottili, tortuose e ramificate. Quando la parte centrale è omogenea o quasi, somiglia insieme con le sue propaggini ad un corpuscolo osseo.

Coltura in brodo. — Intorbidamento appena percettibile, con sedimento scarsissimo. senza mai pellicola in superficie.

Strisciamento su agar. — L'accrescimento avviene in forma di sottilissimo velo trasparente e visibile solo in adatte condizioni di luce.

Infissione in gelatina. — Si forma un nastrino sottile dal quale, per tutta la sua altezza, irradiano tutt'intorno ramuscoli finissimi e quasi eguali: la coltura è paragonabile a un delicato albero di abete o ad uno spazzolino da lume.

Le terminazioni dei ramuscoli col tempo s'intrecciano formando come dei bioccoletti, che restano isolati. Intanto nella parte alta dell'infissione si vien formando una escavazione della gelatina, di forma lenticolare molto allungata, oppure leggermente conica con l'apice in basso. Il terreno non è mai liquefatto.

Coltura in latte. — Il germe vi si moltiplica senza coagularlo ed impartendogli una reazione leggermente alcalina.

Strisciamento su patata. — Non vi si sviluppa sempre; quando ciò accade, si ha una stria esilissima appena percettibile.

Attività biochimiche.

Il B. del mal rossino non produce indolo; talora produce idrogeno solforato; scinde il glicosio con formazione di acidi.

Azione patogena.

Oltre il maiale, sono recettivi il topo ed il piccione; meno il coniglio; la cavia è refrattaria.

Inoculando una coltura virulenta sotto cute o nel peritoneo del topo o del piccione, se ne produce la morte in 3-4 giorni. Alla sezione il fatto più importante è la tumefazione e la consistenza molle della milza; gli altri visceri sono semplicemente congesti. I germi si riscontrano nel fegato, nei reni e sopra tutto nella milza, nel midollo osseo, nelle ghiandole linfatiche e nel sangue.

Non si sono ottenuti veleni di sorta alcuna dalle colture di questo germe.

Azione antigena.

I maiali che hanno superato un'infezione di mal rossino restano immunizzati. Già Pasteur e Thuillier pensarono di conferire artificialmente l'immunità agli animali sani, inoculando loro colture attenuate in due gradi, primo e secondo vaccino. L'attenuazione si può ottenere mediante il calore. L'esperienza ha dimostrato che le vaccinazioni contro il mal rossino riescono efficaci.

Immunizzando con ripetute iniezioni di quantità ben dosate di coltura il coniglio e poi sacrificandolo e triturandone i visceri, si ottiene un estratto che, filtrato, dimostra proprietà vaccinanti e terapeutiche (Emmerich, Leclainche ed altri).

Dai conigli immunizzati si può ottenere un siero (Mesnil) che, in piccole dosi, frazioni di cmc., ha virtù preventive ed anche curative, purchè sia inoculato non oltre le 24 ore dopo l'iniezione del virus. Tale siero non ha tuttavia potere battericida, ma solo agglutinante; e questo non può certamente essere la causa dell'immunità. Trattasi forse di una immunità batteriotropa.

Lorenz ha proposto un metodo di sierovaccinazione, che consiste nell'inoculare prima una certa dose di siero specifico, e poi, dopo 2 e dopo 12 giorni, i due vaccini.

Isolamento e identificazione.

Il B. del mal rossino si può isolare dal sangue o da qualsiasi organo dei maiali. Se l'esame microscopico ha dimostrato l'esistenza del solo germe che si vuole isolare, si fa una coltura in brodo o in gelatina o su agar in tubi. Se invece insieme col B. del mal rossino trovansi altri germi, il che può accadere quando l'animale sia morto da un certo tempo, bisogna fare le colture a piatto.

L'identificazione riesce facile per i caratteri netti che possiede questo germe.

Il *Bac. murisepticus*, patogeno per i topi, è quasi identico al B. del mal rossino; unicamente si distinguono fra loro perchè il primo non è patogeno per il maiale: le differenze colturali addotte da alcuni autori sono troppo lievi ed incostanti. Per questo appunto il B. del mal rossino oramai si considera come nient'altro che una forma di adattamento del B. murisettico all'organismo del maiale.

Bacillus anthracis

o *B. del carbonchio ematico.*

Fu già visto da Rayer e Davaine nel 1850, poi da Pollender nel '55 e da Brauell nel '57; solo nel '63 però Davaine ne riconobbe l'importanza etiologica.

Koch lo isolò per primo dall'animale nel 1876, ne dimostrò le spore, e sperimentò l'azione patogena delle colture pure.

È causa della pustola maligna, del carbonchio intestinale e del carbonchio polmonare nell'uomo; nei bovini, negli ovini, nei cavalli, è causa del carbonchio ematico, conosciuto nei vari paesi con nomi differenti.

Si trova nell'organismo malato, ed in forma di spore in diversi oggetti commerciali che ne provengono. come pelli, lana, crini, pennelli, ecc.; si può anche trovare nel suolo, dove siano stati scorticati o interrati cadaveri carbonchiosi:

Caratteri microscopici.

Bastoncini cilindrici, diritti, larghi 1-1.2 μ, lunghi 3-6-8 μ, assolutamente immobili, senza ciglia, sporogeni. Allo stato fresco dimostrano l'estremità leggermente convesse; il taglio netto che esse presentano nei preparati colorati è conseguenza dei nostri artifici tecnici. Nell'organismo (v. fig. 525) sono isolati o riuniti in file di 2-4, talora 6-8 elementi, non più; nelle colture artificiali, specialmente in sostrati liquidi, si presentano in lunghissime catene, composte di numerosi articoli quasi uguali fra loro. I singoli individui di queste catene nei preparati colorati hanno talora le estremità concave con un lieve accenno di rigonfiamento a cercine (v. fig. 526): in tal caso la catenella rende l'impressione di una canna di bambù, ma anche questo aspetto è conseguenza degli artifici che si usano per la colorazione, come già è stato detto per l'apparenza tronca che le estremità dei bacilli spesso dimostrano.

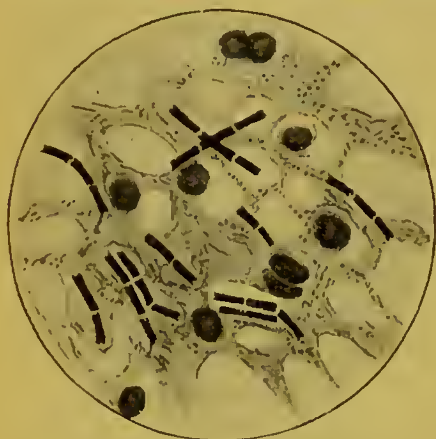


Fig. 525. — B. del carbonchio, dall'organismo.

Il B. del carbonchio si colora con tutti i colori basici d'anilina, e resiste sempre bene al metodo del Gram.

Nell'organismo esso circondasi in generale di una capsula più o meno ampia; se vi sono due o più elementi in fila, essi hanno capsula comune, che allora può anche mostrarsi leggermente strozzata a livello della linea di divisione dei singoli individui.

La capsula si produce anche in siero di sangue, o in terreni che contengano siero o altro liquido equivalente. Circa la sua struttura v. pag. 1359. Nei preparati fatti col metodo di Gram essa vedesi chiaramente, se anche rimasta incolora; usando come colore di contrasto l'eosina non di rado si tinge in un rosa più o meno evidente. Per i metodi speciali di colorazione v. pag. 1241.



Fig. 526. — B. del carbonchio, da coltura.

Le spore del B. del carbonchio sono ellittiche, grandi 1-1.2 × 1.5-2 μ, hanno posizione mediana o quasi, non deformano il corpo dei bacilli che le producono. Secondo l'età delle colture si possono vedere spore ancora in prevalenza contenute nei corpi bacillari, o spore quasi tutte libere, con pochi residui bacillari. Le spore mature viste a fresco appaiono corpicciuoli splendenti, per il loro forte potere di refrazione. Esse hanno una membrana assai resistente alla penetrazione delle sostanze coloranti, così che nei preparati colorati semplici restano scolorate: per tingerle bisogna ricorrere quindi a metodi speciali (v. pag. 1237).

Colture.

Il *Bac. anthracis* cresce bene in tutti i sostrati nutritivi; è aerobio, con facoltà di leggiera anaerobiosi; ha l'ottimo di temperatura a 37°, il minimo a 12°, il massimo a 43-44°.

Le condizioni di sporificazione non sono tutte le medesime della semplice moltiplicazione vegetativa. Così l'ottimo termico è secondo Koch 20-25°, secondo Günther 28°, secondo Kitt 30°, secondo altri 31-35°: in ogni modo è sempre inferiore a 37°. Il minimo è 11-16°, il massimo 40-41°. Coltivando il germe a temperature di 42-43°, esso non produce più spore: si hanno così delle colture asporogene. È necessaria la presenza di ossigeno libero: nell'organismo animale vivente o appena morto non si hanno mai spore. I terreni di coltura più favorevoli alla produzione delle spore sono l'agar e la patata.

Per cause o per artifici diversi il B. del carbonchio può perdere la facoltà di sporificare, diventa asporogeno. Ciò può accadere in alcuni stipiti mantenuti in coltura, che da lungo tempo non siano stati più trapiantati; come in altri che siano conservati per successivi passaggi in terreni glicerinati.

Coltivandolo sempre a 42°-42°.5, per più trapianti consecutivi, si ha uno stipite che a poco a poco perde la facoltà di sporificare, anche se poi le nuove colture si facciano sviluppare a 30°; lo stesso può ottenersi, ma incostantemente e con minor sicurezza, coltivandolo in brodo contenente 0.8-1.2 ‰ di fenolo (Roux) o circa 0.5 ‰ di bicromato potassico (Chamberland e Roux), oppure in sieri di cavallo, di bue o di pecora (Bormans).

Sebbene si noti spesso che la perdita della facoltà di sporificare coincide a un dipresso con la perdita della virulenza, pure i due fatti non hanno alcun rapporto causale evidente, perchè vi sono razze asporogene virulente come alcune sporogene, e viceversa capitano razze sporogene avirulente come alcune asporogene.

Colonie in agar. — Le colonie superficiali sono rotondeggianti, del diametro di 2-4 mm., piane, piuttosto spesse, opache, biancogrigiastre, con lucentezza grassa. A piccolo ingrandimento mostrano una massa

compatta, costituita da un vago intreccio di fascetti di filamenti ondulati: alla periferia questi, assottigliandosi, ma con andamento flessuoso, si prolungano tutt'intorno a guisa di riccioli (v. fig. 527): il colore delle colonie è giallo più o meno chiaro. Le colonie profonde sono per lo più rotondeggianti, di color giallo scuro, con propaggini corte e sottili, ma nodose e ramificate, essendo le ramificazioni talvolta intrecciate fra loro.



Fig. 527. — Colonia di B. del carbonchio.

Colonie in gelatina. — Le colonie superficiali somigliano a quelle in agar, ma anche ad occhio nudo spesso fanno vedere tutt'intorno dei riccioli più o meno lunghi; dopo 3-4 giorni, essendo cominciata la fluidificazione della gelatina, si approfondano, e a poco a poco perdono i riccioli periferici, che si disgregano in massettine granulose nella gelatina liquefatta.

A piccolo ingrandimento appaiono opache, grigiogiallastre nel mezzo, quasi incolore e trasparenti nella zona marginale: sono evidentissimi i riccioli ed i loro intrecci, fuorchè nel centro, finchè non interviene la fluidificazione; giacchè allora si disfanno, come è stato detto, in massettine granulose.

Coltura in brodo. — Il B. del carbonchio cresce nel brodo senza intorbidarlo, senza dare pellicola in superficie, ma producendo dei fiocchettini che restano sospesi nel liquido, presso le pareti del tubo, ed un sedimento omogeneo, soffice, biancastro.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, piuttosto spessa ed opaca, più rilevata nella parte mediana che nei margini, con superficie finissimamente granita, come se fosse cosparsa di minutissimi punti argentini, con lucentezza sericea: i margini possono essere lisci, ondulati, o anche delicatamente sfrangiati. Acqua di condensazione coi caratteri della brodocoltura.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo, biancastro, dal quale tutt'intorno irradiano delle barbe ramificate. Queste possono essere più lunghe in alto e gradatamente più corte in basso, fino a cessare del tutto: in tal caso la coltura ha l'aspetto d'un albero d'abete capovolto (v. fig. 528).

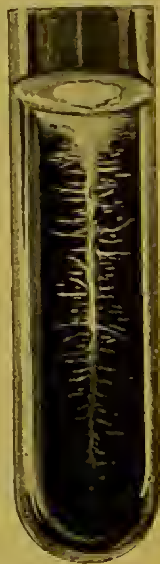


Fig. 528. — Infissione di B. del carbonchio in gelatina.

Talora le barbe sono uguali dall'alto al basso, ed allora la coltura si rassomiglia ad uno spazzolino da lume. Altre volte dei tratti con barbe si alternano con tratti senza barbe; e può anche accadere che queste siano appena accennate, sicchè allora l'infissione somiglia ad un cordoncino delicatamente squammoso. La gelatina viene lentamente e debolmente fluidificata, prima a scodella, poi ad imbuto, finalmente a cilindro.

Coltura in latte. — Il B. del carbonchio cresce nel latte, coagulandolo con lentezza, e poi ridisciogliendo il coagulo: la coagulazione avviene per opera enzimatica.

Strisciamento su patata. — Patina simile a quella in agar, di colore bianco sporco, che risalta meglio dopo alcuni giorni, quando la patata è leggermente imbrunita.

Vitalità in coltura. — La vitalità delle colture dei B. del carbonchio è lunghissima, ed è dovuta alle spore: si sono ottenuti dei trapianti da colture vecchie di molti mesi e perfino di qualche anno.

Attività biochimiche.

Il B. del carbonchio non produce indolo, bensì triptofane; dà poco idrogeno solforato; scinde il glicosio con produzione di acidi acetico e capronico, non di gas; non attacca il lattosio. Esso è inoltre capace di sciogliere il siero di sangue coagulato, certamente per azione enzimatica.

Azione patogena.

La virulenza del bacillo del carbonchio è mutevole, e nelle colture artificiali a poco a poco diminuisce e si perde. Si può tuttavia esaltarla, passando il germe parecchie volte per l'organismo animale, ed usando a ciò individui molto giovani: topolini dell'età di 2-4 giorni o cavie di 7-8 giorni.

All'infezione carbonchiosa sperimentale sono recettivi, oltre i bovini e gli ovini, che tanto frequentemente ne ammalano, ed oltre gli equini che pur ne ammalano spontaneamente, ma più di rado, anche il topo, la cavia ed il coniglio; assai meno recettivi sono il topo bianco e il ratto; quasi refrattario il maiale, refrattari il cane e gli uccelli, specialmente il pollo.

L'infezione si ottiene con maggior sicurezza inoculando i germi sotto cute, ma anche nelle vene e nel peritoneo.

Inoculando una piccola quantità di coltura virulenta sotto cute nella cavia, questa dopo un giorno circa presenta respiro accelerato, urinazione frequente, più tardi assopimento ed ipotermia; finalmente cade in coma e muore.

Alla sezione si trova nel punto inoculato un edema gelatinoso più o meno esteso e soffuso di sangue: la milza è ingrossata, scura, spappolabile; il fegato ed i reni sono congesti; così pure le capsule surrenali, che talora presentano punti emorragici, ed i polmoni; il sangue è nerastro, fluido, di aspetto piceo, coagula lentamente e non arrossa all'aria. I bacilli abbondano nell'edema sottocutaneo, dove sono forniti di capsula, nel sangue, nella milza, nell'epiploon ed in genere in tutti i

visceri: nelle sezioni istologiche si riconosce come i bacilli siano principalmente addensati nei capillari; nei reni i capillari dei glomeruli ne sono letteralmente infarciti.

Veleni.

Molti sono i tentativi fatti per ottenere dei veleni dalle colture del B. del carbonchio o dagli organi degli animali carbonchiosi.

Fino ad ora però si può dire che non si è mai riusciti ad ottenere non dico una vera tossina solubile, cui sarebbe fuor di luogo pensare, data la natura eminentemente settica della malattia, ma neppure una endotossina coi caratteri definiti da R. Pfeiffer per questo tipo di veleni.

Marmier asserì di avere ottenuto una tossina carbonchiosa, seminando il germe in soluzione di peptone purificato, contenente circa il 4 % di glicerina e piccole quantità di fosfati, e coltivandolo per due giorni a 37°, poi per 15 giorni a 20°. Filtrate le colture, precipitava egli il filtrato con solfato d'ammonio; al precipitato aggiungeva poca glicerina, che decantava dopo due giorni, sostituendola con altra glicerina, destinata a rimanere sul precipitato altri due giorni. Le porzioni di glicerina, riunite e mescolate col loro quadruplo volume di alcool, davano un precipitato: questo, lavato prima con alcool ed etere, veniva essiccato nel vuoto. Si otteneva così una sostanza amorfa bruna, solubile in acqua, che non dava alcuna reazione delle proteine o dei proteosi nè degli alcaloidi, e che in quantità di parecchi cgr. era tossica per gli animali d'esperimento.

Tale tossina non restava distrutta per il riscaldamento a 110°. Marmier avrebbe ottenuto la stessa sostanza in modo più semplice, macerando in alcool a 20° patine di fresche agarcolture, poi filtrando il liquido, e precipitando il filtrato con alcool assoluto: la tossina era contenuta nella sostanza precipitata.

Ma questi risultati di Marmier, che fino a un certo punto parevano concordare con quelli di Brieger e Fränkel e di Sidney Martin, non furono confermati da altri. Conradi, sia attenendosi al metodo Marmier, sia adoperando vari altri metodi, non potè mai ottenere sostanze la cui tossicità non fosse di almeno 2-22 gr. per chilo d'animale.

Dalle ricerche di Kruse e Bonaduce, Levy e Pfersdorff, Vaughan ed altri si desume che tanto i corpi bacillari quanto i differenti loro prodotti sono sforniti di potere tossico.

Anche introducendo nel peritoneo di animali recettivi sacchetti di collodio contenenti una coltura di B. del carbonchio, non si ottiene mai un'intossicazione.

Neppure a Casagrandi, che adoperò vari procedimenti, riuscì di isolare alcuna tossina speciale dagli organi o dal sangue di animali carbonchiosi. Egli ottenne però da organi diversi, usando il metodo di Lustig e Galeotti, un nucleoproteide avente un'azione tossica assai maggiore di quella che mostra il nucleoproteide di organi sani; tale

sostanza ha infatti un'intensa azione coagulante, necrotica e pirogena, ma la maggior tossicità è dovuta al nucleoproteide del B. del carbonchio, il quale trovasi negli estratti insieme con quello degli organi.

Azione antigena.

In generale si è potuto accertare che un'infezione carbonchiosa felicemente superata conferisce immunità all'organismo. Anche negli animali più recettivi, sebbene l'infezione per lo più sia mortale, pure non mancano casi comprovanti lo stato d'immunità consecutivo ad infezioni leggiere.

Pasteur pensò di conferire artificialmente l'immunità anticarbonchiosa ai bovini ed agli ovini, adoperando colture attenuate in diverso grado, che diconsi primo e secondo vaccino. Il primo è costituito da colture allestite con sangue carbonchioso e mantenute per 8-10 giorni a 42°.5: esso non uccide il coniglio nè la cavia, ma è ancora virulento per il topo.

Il secondo vaccino è dato da colture similmente mantenute a 42°.5, ma per un tempo più breve, di 4-5 giorni: non uccide il coniglio, ma oltre al topo uccide anche la cavia, quindi è più virulento del primo.

I due vaccini s'inoculano sotto cute, prima il più debole, poi il più forte, a distanza di 12 giorni circa.

Passati altri 12 giorni dopo la seconda inoculazione gli animali vaccinati hanno acquistato una salda immunità specifica, e possono impunemente essere inoculati con coltura virulenta.

La dose dei due vaccini da inoculare è indicata dai diversi Istituti che li producono. In genere s'inietta, sia dell'uno che dell'altro, ¼ di cmc. nei bovini, ⅛ nelle pecore.

L'immunizzazione dei piccoli animali riesce più difficile. Hankin credette di esser riuscito a separare dalle colture una sostanza quasi atossica, con proprietà immunizzanti. Egli coltivò il germe in brodo fatto con estratto Liebig 1 % e contenente 10-50 % di fibrina fresca: dal filtrato di questa coltura, per mezzo di precipitazioni prima con solfato d'ammonio, poi con alcool, ottenne un'albumosa, che nella proporzione di 1.5 : 1,000,000 conferiva ai topi una certa resistenza verso il B. del carbonchio: si tratta di effetti scarsi, in ogni modo assai poco durevoli, come dimostrò Petermann. Dalle esperienze di Casagrandi inoltre appare che tanto i filtrati delle colture quanto gli estratti dei corpi batterici hanno poca o punta azione immunizzante. Pare dunque che un vero stato d'immunità attiva rispetto al carbonchio nei piccoli animali non si possa ottenere che inoculando prima dei vaccini e poi delle colture virulente. Tuttavia riuscì a Tiberti di immunizzare col nucleoproteide carbonchioso anche dei conigli, oltre che capretti ed agnelli.

Sclavo per primo riuscì ad immunizzare validamente animali di mezza e grossa taglia, in maniera da ottenerne un siero specifico. Il

suo metodo consiste, in generale, nell'inoculare prima i vaccini Pasteur, e poi colture virulentissime. Il montone così trattato dà un siero che nella dose di 2 cmc. salva il coniglio da un'infezione sicuramente mortale. L'animale più specialmente atto a fornire un siero anticarbonchioso molto efficace è l'asino. Ottolenghi ha provato che iniettando il siero Sclavo nel peritoneo di una cavia si riesce a salvarla da un'infezione sicuramente letale di carbonchio, anche quando questa si faccia 24 ore dopo. Tale siero ha proprietà terapeutiche, per le quali viene adoperato con buon successo nei casi d'infezione carbonchiosa nell'uomo e negli animali. Esso è anche adoperato preventivamente: inoculando nei capi di bestiame contemporaneamente siero e bacilli attenuati, si conferisce loro un'immunità passiva, che li protegge immediatamente contro un'eventuale infezione, mentre dà tempo all'organismo di reagire al vaccino per procurarsi un'immunità attiva.

Marchoux in Francia e Sobernheim in Germania anch'essi ottennero, posteriormente, con procedimenti analoghi a quelli di Sclavo, sieri anticarbonchiosi, sulla cui efficacia oramai si hanno dati di fatto concordi.

Non è bene assodato a quali proprietà si debba l'efficacia immunizzante e terapeutica del siero anticarbonchioso.

Sostanze battericide per il B. del carbonchio esistono già nel siero normale degli animali che si immunizzano per la produzione del siero specifico: ma nel siero specifico non appaiono aumentate, quindi non può essere cercata in loro la causa dell'immunità. Neppure si può pensare ad un potere antitossico, perchè, se anche si volesse ammettere, non si può dimostrare, visto che non si è mai ottenuta una vera tossina dalle colture del germe o dagli organi degli animali infetti. Secondo Sclavo, le proprietà specifiche del siero possono essere dovute a batteriotropine. Secondo Ascoli, il siero impedirebbe semplicemente la moltiplicazione dei germi, avrebbe quindi un'azione antiblastica, secondo l'espressione da lui introdotta. È un argomento, come si vede, non ancora concordemente chiarito, sul quale ben poca luce ha gettato lo studio delle condizioni dell'immunità naturale di alcuni animali, specialmente del pollo e del cane.

I sieri anticarbonchiosi hanno potere agglutinante sulle sospensioni colturali omogenee di B. del carbonchio, quali soltanto possono ottenersi da stipiti attenuati: può servire per esempio il primo vaccino Pasteur.

Bisogna avvertire però che il siero normale di molti animali agglutina in diluzioni di 1 : 10-1 : 50, e quello dell'uomo talora può agglutinare perfino in diluzioni maggiori.

Meglio dimostrabili sono le precipitine.

Un buon siero precipitante si ottiene, secondo A. Ascoli, inoculando nelle vene di un asino più volte, con intervalli di pochi giorni, colture avirulente, cominciando con 1-2 anse, continuando con 1-2 patine

di agarcolture in provetta, e terminando con 1-3 patine di agarcolture su piastra: in capo a 6-7 settimane si ottiene un siero molto attivo.

Questo siero precipitante è adoperato per rivelare negli organi di cadaveri sospetti carbonchiosi l'esistenza del precipitogeno specifico, quindi ha scopo diagnostico. Questa è la reazione zonale di Ascoli, e si eseguisce così.

Un pezzetto di organo, meglio sempre un pezzetto di milza (Roncaglio), si tritura e si fa bollire per pochi minuti nel triplo o quintuplo del suo peso di soluzione fisiologica: quando il liquido è raffreddato, si versa sul filtro d'amianto della provettina descritta a p. 1320, in cui già sia stata versata una certa quantità di siero precipitante. La reazione è positiva quando nella zona di contatto fra il siero ed il filtrato, che vi si adagia sopra, si forma un caratteristico anello torbido, che significa precipitazione. Il fenomeno si compie rapidamente.

Isolamento e identificazione.

Tanto dal sangue e dagli organi dell'uomo o degli animali morti, quanto dal secreto della pustola maligna nell'uomo vivente, il B. del carbonchio si isola facendo strisciamenti multipli su agar a piatto. L'isolamento del germe dal sangue *intra vitam* riesce facile per lo più soltanto alcune ore avanti la morte.

Le colture si mettono a sviluppare a 37°. Le colonie caratteristiche si riconoscono al microscopio: si pescano, e se ne fanno colture in provette.

Per l'identificazione bisogna tenere presenti tutti i caratteri morfologici e biologici descritti del B. del carbonchio. Vi sono dei germi che possono trovarsi insieme con esso nei cadaveri e che gli somigliano per alcuni caratteri; così pure ve ne sono altri isolati da ascessi, da polveri di carne, da patate, ecc., ed altri ancora che trovansi nell'ambiente, che per qualche carattere somigliano al B. del carbonchio, e le cui proprietà meritano quindi di essere conosciute sommariamente.

Ritenendo superflua una particolare descrizione di essi, diamo semplicemente uno specchietto in cui si notano solo i caratteri distintivi. Da esso restano esclusi quei germi che in niente altro differiscono dal B. del carbonchio se non nell'azione patogena, quindi possono considerarsi come forme fin dall'inizio attenuate o avirulente. La maggior parte di questi germi si differenziano già per la mobilità: Ottolenghi ha notato che di alcuni bacilli similcarbonchiosi le spore presentano un germogliamento equatoriale, come quelle del *Bac. subtilis*, e non polare come del *Bac. anthracis*.

Specie	Movimento	Brodocultura	Infissione in gelatina	Colonie	Azione patogena per la cavia
Bac. pseudanthracis.	+	torbida, con pellicola	con barbe	come *B. anthracis*	leggiera
» *anthracoides* . .	+	come *B. anthracis*	con barbe	come *B. subtilis*	....
» *subtilis*	+	torbida, talora pellicola	senza barbe	coronate da raggiera di filamenti sottili, diritti, nodosi, talvolta ramificati	puramente locale
» *megatherium* .	+	torbida, spesso pellicola	senza barbe, fluidificazione a sacco	come *B. subtilis*	—
» *mycoides* . . .	+	limpida con pellicola	con barbe	talora come *B. anthracis*, altre volte come *B. subtilis*	—
» *radicosus* . . .	—	id.	id.	id.	—
» *vulgatus* (*mesentericus*)	+	torbida, con pellicola zigrinata	senza barbe	come *B. subtilis*	—
» *cadaveris* (anaerobio)	—	....	non cresce	....	edema locale

Diagnosi batteriologica del carbonchio. — Da quanto è stato detto si raccoglie il seguente schema da seguire allorchè si deve fare una diagnosi batteriologica di carbonchio:

1. Si fanno del materiale preparati a strisciamento, che si colorano parte con la tionina fenica, parte col metodo di Gram. Tutti i germi che somigliano al B. del carbonchio, ma che non restano colorati col metodo di Gram, non sono bacilli del carbonchio. Si ponga mente al fatto che i bacilli sono isolati o riuniti in file di pochissimi articoli, e che non di rado possiedono una capsula. La presenza o assenza di questa per altro non costituisce che un criterio di probabilità, poichè possono averla anche alcuni bacilli saprofiti, e d'altra parte possono mancarne i veri bacilli del carbonchio.

2. Si fanno, se occorre, anche dei preparati in goccia pendente: qualunque germe mobile non è mai il B. del carbonchio.

3. Si allestiscono colture a piatto in agar, e s'identificano le colonie con l'osservazione microscopica e con lo studio delle colture che si ottengono trapiantandole in tubi.

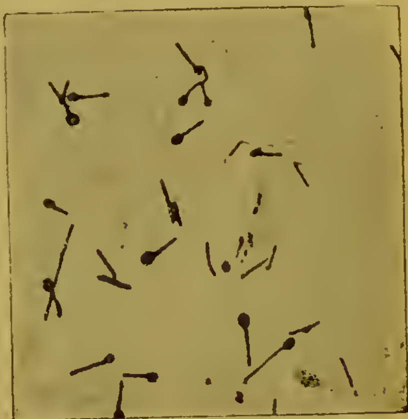
4. S'inocula un po' del materiale, convenientemente allungato, sotto cute nella cavia: altrettanto si fa della prima coltura pura ottenuta.

La diagnosi di carbonchio è certa solo quando tutti i risultati delle ricerche sono positivi e concordi.

Bacillus tetani
o *B. del tetano.*

La natura infettiva del tetano fu scoperta da Carle e Rattone nel 1884; Nicolaier dimostrò il bacillo nelle ferite tetaniche nel 1885; Kitasato lo isolò nel 1889.

I bacilli del tetano si trovano, in numero sempre piccolo, soltanto nelle ferite dei malati, non mai nel sangue o negli organi, solo qualche caso d'eccezione riferito da alcuni autori. Si possono dimostrare nelle feci di cavalli e vitelli sani, raramente in quelle dell'uomo; si ritrovano nella terra di giardino, nello strame delle stalle, talvolta anche nella polvere stradale.


Fig. 529. — B. del tetano.

Caratteri microscopici.

Bastoncini piuttosto snelli, larghi 0.5-0.7 μ e lunghi 1.5-3.5 μ, diritti, con estremità leggermente incurvate, mobili, con lunghissime ciglia, disposte tutte intorno, non ai poli, in numero di 50-60, ben colorabili, resistenti al metodo di Gram. Raramente si vedono filamenti o brevi catenelle. Il numero delle ciglia, che è tanto grande nelle forme giovani, è assai minore nelle forme invecchiate.

Le spore mature sono rotonde o leggermente ellittiche, delle dimensioni di 1.5 × 1.5 2 μ, e si colorano, almeno alla periferia, senza bisogno di espedienti speciali.

Le spore hanno posizione terminale rispetto ai bacilli che le producono; onde risulta un aspetto speciale che ha dato origine alle similitudini di bacchetta da tamburo o di spillo (v. fig. 529). Talora le forme vegetative che hanno prodotto le spore sono alterate, mal colorabili; e nelle colture copiosamente sporificate si trova un gran numero di spore libere.

Colture.

Il B. del tetano cresce nei comuni terreni di coltura, in anaerobiosi; l'ottimo di temperatura è 37°, il minino 15-16°, il massimo 43-44°. Appena isolato dall'organismo dimostrasi strettamente aerobio; ma assuefatto alle colture artificiali diventa a poco a poco meno sensibile alla influenza sfavorevole dell'ossigeno. Perfino si può giungere a coltivarlo in aerobiosi, il che ottennero Tizzoni e Cattani in siero di coniglio. Il B. del tetano si coltiva anche in presenza d'ossigeno a patto che vi siano

insieme altri germi, aerobi, patogeni o saprofiti; oppure che nel terreno di coltura vi siano pezzetti d'organi animali freschi e sterili (Tarozzi: v. p. 1268).

Sono stati qualche volta isolati stipiti di B. tetanico, che si dimostrarono fin da principio meglio coltivabili in aerobiosi che in anaerobiosi (Belfanti, Carbone e Perrero, Kamen, Ferrán).

Colonie in agar. — Sono biancastre e rotonde, con la porzione periferica sottilissima e velamentosa, con orlo regolare o dentellato. A piccolo ingrandimento appaiono giallastre ed opache nel centro, mentre nella zona marginale sono trasparenti e costituite di un intreccio di esilissime propaggini filiformi variamente increspate.

Colonie in gelatina. — Sono biancastre, piccole, quasi puntiformi; mentre si forma un alone di fluidificazione, si vanno approfondando. A piccolo ingrandimento appaiono di colore per lo più giallastro o giallobruno, ed hanno un centro fortemente granuloso ed opaco, il quale è circondato da una corona formata da esili filamenti, che in principio sono corti e diritti, poi diventano lunghi e contorti, a guisa di cavatappi, intrecciandosi variamente fra loro. Col procedere della fluidificazione la porzione estrema di questa corona raggiata si disgrega, assumendo aspetto granuloso.

Coltura in brodo. — Intorbidamento tenuissimo, con poco sedimento al fondo, senza pellicola.

Strisciamento su agar. — Colonie isolate, tenuissime, trasparenti; raramente confluiscono dando una patina tenue come un velo, con margini indistinti.

Infissione in gelatina. — Lungo il tramite d'infissione si formano delle colonie isolate, con aspetto di nubecole, intorno alle quali viene fluidificata la gelatina in forma vescicolare o sacculare: la gelatina liquefatta contiene piccole massettine granulose o nubecolari.

Coltura in latte. — Il B. del tetano cresce nel latte, senza coagularlo e senza alterarne la reazione. Pare che qualche stipite possa coagularlo, però assai lentamente (von Hibler).

Coltura in siero solidificato. — Il B. del tetano, seminato per infissione in siero di sangue coagulato, vi si sviluppa, ora fluidificandolo, ora no.

Attività biochimiche.

Il B. del tetano produce poco indolo, molto idrogeno solforato. Scinde gli zuccheri con produzione di gas e di acidi, che però non sono sempre dimostrabili, a causa della contemporanea formazione di sostanze alcaline derivanti dalla demolizione dei proteici. Annerisce i terreni contenenti poltiglia cerebrale.

Dalle colture, specialmente da quelle in brodo, emana un puzzo caratteristico, che si suol paragonare a quello del corno bruciato.

Il B. del tetano ha potere emolitico, dimostrabile sulle emazie del coniglio; tale potere è dovuto ad un'emolisina solubile, quindi filtrabile insieme con la tossina tetanica propriamente detta o tetanospasmina.

Azione patogena.

Al tetano sono particolarmente recettivi, oltre l'uomo, il cavallo, la cavia, il topo, la capra; molto meno il coniglio e la pecora; quasi del tutto refrattari il cane, il ratto, il piccione, il pollo.

La virulenza o meglio la tossicità del B. del tetano varia notevolmente: diminuisce nelle colture artificiali, specialmente in quelle fatte in brodo e in agar, un po' meno in gelatina e in siero.

Qualunque via d'introduzione, salvo quella delle vie digerenti, si presta all'infezione sperimentale: le vie sottocutanea ed intramuscolare sono le più sicure.

Inoculando dosi piccolissime di brodocoltura, per esempio $^1/_{50}$ di cmc., nel topo o nella cavia, si produce un quadro tetanico tipico, che comincia dopo 12-24 ore e termina con la morte dentro 48 ore. Per ottenere il tetano nel coniglio occorre inoculare dosi 50 e più volte maggiori, ed anche in questo caso i primi sintomi non compaiono mai prima del 2° o 3° giorno, e la morte non sopravviene prima di 8-10 giorni. Allorchè per la poca virulenza o per la scarsa dose la cavia ed il coniglio non presentano sintomi tetanici rispettivamente dopo 4-5 giorni o dopo 7-8 giorni, essi ammalano di una forma cronica di tetano, che dura 2-4 settimane e può avere esito in guarigione. In ogni caso i sintomi tetanici cominciano sempre dalla regione in cui la coltura fu inoculata, potendo anzi rimanere localizzati se la dose è stata molto piccola. Alla sezione non si trova nulla nel punto inoculato, o al più una lieve iperemia o un edema leggiero e circoscritto. Nessuna alterazione riscontrasi nei visceri.

I bacilli restano sempre nel punto inoculato, dove non solo non si moltiplicano, ma rapidamente sembrano diminuire, e già dopo 24 ore non sono più dimostrabili al microscopio: si riesce però sempre a coltivarli anche dopo parecchi giorni.

Le spore per sè stesse non producono il tetano: infatti riscaldando a 80° una sospensione di spore o lavandole per privarle di ogni traccia di tossina, e poi inoculandole nel topo, non si ottiene alcun fenomeno morboso: ciò risulta da esperienze di Vaillard e Rouget, che però sono state contraddette da Roncali e poi da Dönitz. Certo è in ogni modo che l'infezione riesce difficilmente. Pare che i leucociti incorporino le spore inoculate, impedendo la germinazione loro, quindi l'intossicazione: questa ipotesi è confortata dal fatto che inoculando un po' di acido lattico, allo scopo di tener lontano i leucociti dal punto d'infezione, si riesce a far germogliare le spore e a produrre i fenomeni

tetanici. L'infezione tetanica è favorita dal maltrattamento dei tessuti e dalla coesistenza di altri germi, anche non patogeni, i quali anzi alla lor volta possono diventar patogeni in presenza della tossina tetanica ed aggravare il decorso dell'infezione (Roncali).

L'infezione tetanica nell'uomo è spesso dovuta appunto alla penetrazione di spore, insieme con altri germi fautori, nelle ferite.

Veleni.

Il bacillo del tetano è patogeno unicamente per il veleno che esso produce, e che dicesi tetanotossina o tetanospasmina, il quale ultimo nome accenna al carattere generale dei sintomi dell'intossicazione. Con esso naturalmente non vanno confusi quei veleni semplici, che aveva isolato Brieger e che appartengono al gruppo delle ptomaine.

Per ottenere la tossina, si semina il bacillo in brodo di carne bovina contenuto in palloni, si provvede all'anaerobiosi, e si lascia per 4-5 settimane a 38°.

La coltura ottenuta si filtra per candela di porcellana. Il filtrato ha vario grado di tossicità, secondo lo stipite adoperato: si possono ottenere veleni. che in dosi di $^1/_{1000}$, $^1/_{4000}$, $^1/_{10000}$, $^1/_{20000}$ di cmc. uccidono un topo di 15 gr. La tetanotossina si può ottenere allo stato solido precipitandola dai filtrati con solfato ammonico: però durante le manipolazioni circa una metà della tossina contenuta nel liquido va perduta. L'inoculazione della tossina produce effetti identici a quelli della coltura. Essa diffondesi rapidamente per l'organismo: le vie che segue per arrivare al sistema nervoso centrale, che è la sede della sua azione elettiva, variano secondo la via d'inoculazione. Dalle ricerche di Tiberti risulta che la tossina iniettata sotto cute in piccola parte è direttamente assorbita dalle terminazioni nervose locali, mentre il resto passa per i linfatici nel sangue; inoculata nella spessezza dei muscoli glutei, imbeve la sierosità muscolare, dalla quale penetra poi sia nelle terminazioni nervose sia, per i linfatici, nel sangue; introdotta nelle vene, passa prima nel sistema linfatico e quindi nelle vie nervose, distribuendosi uniformemente nell'organismo: in tal modo si comprende come secondo la via d'inoculazione i sintomi tetanici in un caso colpiscano vari gruppi muscolari, a tappe, ed in un altro caso scoppino contemporaneamente in tutti i muscoli.

Delle varie parti del sistema nervoso centrale quella su cui più avidamente si fissa la tossina è il midollo spinale. Inoculando la tossina sotto la dura madre nel coniglio, si ottiene un quadro sintomatico speciale conosciuto col nome di tetano cerebrale (Roux e Borrel).

La tossina tetanica viene fortemente attenuata dal riscaldamento a 65° per mezz'ora, distrutta a 80° per tre ore; è pure distrutta dai raggi solari in pochi giorni; si attenua per l'azione della luce diffusa

e dell'aria. Insieme con la tetanotossina nei filtrati si riscontra anche l'emolisina, della quale si è già parlato, ed un enzima proteolitico, che scioglie la gelatina.

Diagnosi di tetano mediante la dimostrazione di tossina circolante. — Nel sangue di malati di tetano trovasi della tossina libera: di questa conoscenza si profitta per diagnosticare sperimentalmente alcuni casi di tetano, specialmente del così detto tetano reumatico. A tal uopo si salassa l'infermo, si separa il siero dal sangue e s'inietta sotto cute in un topo 0.5-1 cmc. del siero. In caso positivo il topo presenterà i sintomi dell'intossicazione tetanica.

Azione antigena.

L'azione antigena del bacillo del tetano è essenzialmente legata alla sua tossina.

Si possono immunizzare i conigli sia usando colture intere, sia masse sporali, sia filtrati. Brieger, Wassermann, Kitasato adoperarono per immunizzare il coniglio una coltura in acqua peptonata di 24 ore, quindi senza spore, mescolata col doppio volume di brodo di timo: ne iniettavano sotto cute dosi gradatamente crescenti con vari intervalli.

Vaillard immunizzò il coniglio inoculandogli più volte sotto cute piccolissimo numero di spore lavate e mescolate con un po' di acido lattico.

Assai più importante è l'immunizzazione fatta coi filtrati sterili. Behring e Kitasato ottennero l'immunità del coniglio inoculandogli le prime volte tossina attenuata con tricloruro di jodio, e poi tossina inalterata. Tizzoni e Cattani del resto provarono che si possono ottenere colture inizialmente attenuate, usando alcune precauzioni nel prepararle, e che con esse possono immunizzarsi non solo il coniglio, ma anche il cane, il piccione, la cavia, il topo. Dal siero degli animali immunizzati essi ottennero, mediante precipitazione con alcool o solfato di magnesio, una globulina dotata di potere immunizzante.

Behring e Kitasato dimostrarono che il siero degli animali immunizzati ha potere antitossico, efficace negli animali d'esperimento non solo come preventivo ma anche come curativo: per ottenere un siero attivissimo si servirono, come fecero anche Tizzoni e Cattani, del cavallo. Si comincia coll'inoculare piccole dosi di tossina attenuata col tricloruro di jodio o anche col calore, e, con intervalli di pochi giorni, si ripete l'inoculazione di tossina attenuata in dosi crescenti: solo quando il siero del cavallo si dimostra molto attivo nell'immunizzare il topo, s'imprende una serie d'inoculazioni di tossina intatta, in quantità prima piccole, poi sempre maggiori, con intervalli di tempo regolabili volta per volta sulla guida delle reazioni presentate dall'animale. Dopo tre mesi circa di questo trattamento, il cavallo può dare già un

siero con alto potere antitossico, che si mantiene o si esalta iniettando ogni tanti giorni forti dosi di tossina.

Il salasso dell'animale si fa una dozzina di giorni dopo l'ultima iniezione. Secondo Tizzoni, giova dopo un primo salasso far riposare il cavallo per due mesi, e poi riprendere la serie delle inoculazioni.

Il siero antitetanico si conserva bene per lungo tempo allo stato secco: perciò si suole essiccarlo nel vuoto.

Per avere un'idea del potere antitossico del siero, ricordiamo che questo può neutralizzare 10-20 volte il suo volume di tossina.

Il siero antitetanico è adoperato nella pratica sia nel tetano umano sia nel tetano degli animali. Profilatticamente si adopera in casi di ferite che si presumono infette di bacillo tetanico. Nella cura del tetano il siero dev'essere inoculato il più presto possibile, in dosi considerevoli.

Tizzoni consiglia di fare una iniezione di antitossina intorno alla ferita.

Pare che in casi gravi riesca efficace l'iniezione sottodurale del siero nello speco vertebrale o nel cranio.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento del bacillo del tetano è in generale difficile. Per ottenerlo in coltura pura dal secreto o dal pus di una ferita, Kitasato consiglia il seguente metodo, fondato sulla resistenza delle spore al calore. Si semina il materiale in brodo di carne bovina, si fa il vuoto nel recipiente e si tiene per 4-5 giorni a 38°. In questa coltura, ammettendo che il materiale seminato contenga il bacillo del tetano, si vedono molte forme a spillo, insieme con altri germi anaerobi.

Da essa coltura si aspirano poche gocce in un tubetto sottile, che si chiude ai due estremi sulla fiamma e si riscalda per uno o due minuti a 100° in bagnomaria; poi il contenuto si semina in brodo per ottenere una nuova coltura, secondo le stesse regole adottate per la prima. Può accadere che nella seconda coltura il bacillo del tetano si trovi già allo stato di purezza; se così non è, si ripete l'operazione altre due o tre volte.

Tuttavia il bacillo del tetano spesso trovasi frammisto con altri anaerobi patogeni o non patogeni, le cui spore sono anche molto resistenti. In tal caso non vi è altro mezzo che far seguire al metodo di Kitasato una coltura d'isolamento in tubi di Vignal o in coltura a piatto. Questa si può allestire col procedimento della plastilina; del resto Tizzoni e Cattani poterono già isolarlo con le piastre in atmosfera di idrogeno.

Una volta isolato il bacillo del tetano, si identifica principalmente per il suo aspetto microscopico e per l'azione patogena nella cavia e nel topo.

Un germe che gli somiglia molto è il *Bacillus pseudotetanicus* di Tavel, il quale però si distingue perchè ha soltanto 8-16 ciglia, ed è sprovvisto di azione patogena.

Il bacillo pseudotetanico di Sanfelice (anaerobio n. IX), trovato in infusi di carne e nel terreno, si differenzia unicamente perchè non è patogeno; però si deve considerare come un bacillo tetanico avirulento, perchè Sanfelice, coltivandolo in terreni contenenti veleno tetanico, riuscì a renderlo patogeno.

Bacillus sarcemphysematos

o *Bac. anthracis symptomatici*, *Bac. chauvoei*, *B. del carbonchio sintomatico.*

Fu scoperto da Arloing, Cornevin e Thomas nel 1887.

È causa del così detto acetone o forbicione, malattia dei bovini. Si trova nell'edema sanguinolento e nei muscoli in corrispondenza del caratteristico tumore crepitante; anche nel contenuto intestinale, e costantemente nella bile degli animali malati o morti.

Secondo gli studi di Grassberger e Schattenfroh si possono distinguere due tipi di B. del carbonchio sintomatico; uno, detto il *tipo genuino*, è mobile, l'altro, *tipo denaturato*, è immobile: col secondo tipo concorderebbe il *Bac. saccharobutyricus immobilis*, e probabilmente il così detto *Bac. emphysematosus* seu *phlegmonis emphysematosae* seu *capsulatus aërogenes.*

Premessa questa notizia, descriviamo i due tipi bacillari, conforme alla descrizione di Grassberger e Schattenfroh, senza trascurare naturalmente quello che già si conosceva dell'argomento prima dei recenti loro studi.

Caratteri microscopici.

Bastoncini diritti, con estremità arrotondate, ben colorabili; i giovani resistono al Gram, gl'invecchiati poco o per nulla. Quelli del primo tipo, mobili, sono peritrichi e possiedono 20-40 ciglia, sono grossi 0.6-1 μ e lunghi 3-5 μ, ed hanno tendenza ad includere molta granulosa. Quelli del secondo tipo, immobili, sono grossi 1-1.5 μ e lunghi 2-3, o 5-6, o 7-12 μ; quindi, rispetto agli altri, presentano dimensioni più varie, perciò alcuni assai tozzi, altri molto lunghi; inoltre hanno tendenza a dare anche filamenti lunghi 20-50 μ, non però a rigonfiarsi in forma di fuso (v. fig. 531).

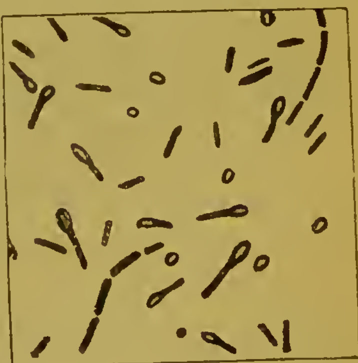


Fig. 530. — B. del carbonchio sintomatico.

Le spore sono abbondanti nel primo tipo, mancano nel secondo; le spore che dà il primo tipo sono ellittiche,

allungate, delle dimensioni di 1.3-1.7 × 1.8-2.3 μ, sono terminali o quasi, e rigonfiano il corpo bacillare in modo che ne risulta una figura di racchetta (v. fig. 530), più raramente sono mediane, nel qual caso il bacillo rigonfiato assume l'aspetto di un fuso o, come si dice, clostridio.

Caratteri colturali.

Le condizioni di sviluppo sono in sostanza le stesse già dette per il B. del tetano; solo è da avvertire che tutti e due i tipi crescono anche a 10°, hanno sempre bisogno di albumina o peptone e di idrati di carbonio solubili, non crescono o crescono malissimo in semplice gelatina.

Colonie in agar zuccherato. — Le superficiali del primo tipo sono piuttosto estese, mucose, ed hanno contorno lobato e profilo indistinto; le profonde sono compatte, hanno forma di cote e propaggini corte a guisa di aculei.

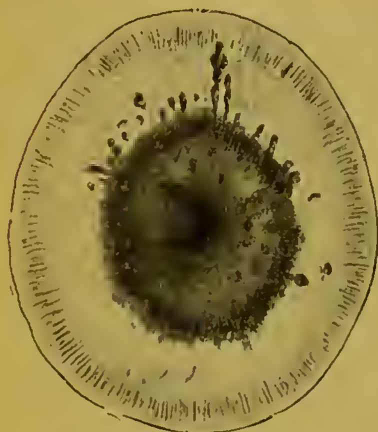


Fig. 531. — Colonia in gelatina del B. del carbonchio sintomatico.

Le superficiali del secondo tipo sono più rigogliose, ed hanno un centro compatto granuloso, circondato da una zona, pure granulosa, terminata da una corona di filamenti più o meno increspati. Le colonie profonde hanno lo stesso aspetto del primo.

Molte bollicine di gas si scorgono nel terreno presso le colonie dell'uno e dell'altro tipo, ma più in quelle del primo.

Colonie in gelatina zuccherata. — Le colonie del primo tipo possono essere compatte, con margine liscio, oppure diffuse e finamente granulose, oppure circondate da prolungamenti tortuosi intrecciati.



Fig. 532. Infissione in gelatina del B. del carbonchio sintomatico.

Le colonie del secondo tipo sono pure compatte, ed al microscopio si dimostrano coronate da esilissimi e brevi prolungamenti, ma sono circondate da un alone di fluidificazione che suole mancare a quelle del primo tipo (v. fig. 531).

Coltura in brodo e strisciamento su agar. — I caratteri di queste colture somigliano moltissimo alle corrispondenti del B. tetanico.

Infissione in gelatina zuccherata. — Il primo tipo dà talora soltanto un nastrino nodoso senza propaggini radiate; altre volte le dà, e sono tortuose e sottili; altre volte dà uno sviluppo diffuso lungo la linea d'infissione e tutto intorno ad essa. Si ha forte produzione di gas, non mai fluidificazione.

Il secondo tipo dà uno sviluppo simile a quello del primo tipo, ma a poco a poco fluidifica la gelatina (v. fig. 532).

Coltura in latte. — Tutti e due i tipi vi crescono, coagulandolo, senza mai ridisciogliere il coagulo, che si mostra attraversato da bolle di gas.

Attività biochimiche.

Il B. del carbonchio sintomatico, attaccando diversi monosaccaridi e disaccaridi e l'amido, produce acido butirrico e acido lattico inattivo o destrogiro. I gas prodotti sono idrogeno ed anidride carbonica.

Non produce indolo, fenolo, sostanze alcaline; produce idrogeno solforato.

Nel primo tipo fra gli acidi grassi derivanti dalla fermentazione predomina l'acido butirrico, e l'acido lattico può essere ulteriormente trasformato in acido butirrico; nel secondo tipo prevale l'acido lattico, che non viene mai ulteriormente trasformato. Ambedue i tipi non anneriscono i sostrati contenenti poltiglia cerebrale.

Azione patogena.

Oltre i bovini, che ammalano spontaneamente di questa infezione, sono anche recettive le capre e le pecore, ed in particolar modo le cavie e i topi; meno recettivi sono i ratti: pochissimo i cani, i gatti e i conigli; refrattari il maiale e l'uomo.

Inoculando il germe nei muscoli della coscia di una cavia, si provoca una tumefazione circondata da una zona edematosa, che si estende ben presto alla parete addominale.

L'animale muore dopo due o tre giorni. Alla sezione, in corrispondenza del punto inoculato, trovasi il connettivo imbevuto di siero e soffuso di sangue, i muscoli di colore giallastro o rosso cupo, e la parte centrale della tumefazione costituita da sanie e bollicine di gas commiste: i tessuti così alterati tramandano odore di burro rancido. Le ghiandole inguinali sono ingrossate, edematose; nel tessuto sottocutaneo dell'addome e del torace vi è un edema diffuso, gelatinoso, talora emorragico. Nella cavità peritoneale trovasi un po' di liquido torbido, i visceri sono al più congesti, la milza è di grandezza e di aspetto normali.

I bacilli trovansi nel tumore locale, nell'edema sottocutaneo, nel liquido peritoneale; nel sangue e negli organi passano soltanto dopo la morte dell'animale, e sempre in numero piccolissimo.

Veleni.

Le brodocolture filtrate per candele di porcellana, o sterilizzate a 115°. dimostrano leggiere proprietà tossiche (Roux); dalle colture in brodo di Martin (v. p. 1257) Leclainche e Vallée ottennero liquidi tossici assai più attivi.

Grassberger e Schattenfroh più recentemente, coltivando il tipo genuino, cioè la forma mobile del germe, in brodo contenente lattato di calcio, ottennero un veleno solubile, capace di uccidere una cavia in dosi di 0.01-0.005 cmc., e simile per la sua costituzione al veleno difterico: infatti gli autori stessi vi hanno dimostrato, oltre la tossina, anche il tossone e i tossoidi.

Azione antigena.

È noto che gli animali che hanno superato un'infezione di carbonchio sintomatico sono diventati immuni. Questa conoscenza empirica ha suggerito il metodo delle vaccinazioni. Come materiale vaccinante si usano i muscoli malati di un bovino, sminuzzati e triturati in mortaio, coi due terzi del loro peso di acqua distillata; il succo che si ottiene filtrando per tela si essicca a 35° e poi si polverizza.

Una parte di tale polvere, bagnata con due parti d'acqua, si tiene 5-6 ore a 100-105°; un'altra parte, similmente umettata, si tiene per la stessa durata di tempo a 90-95°.

La prima polvere rappresenta il primo vaccino, cioè il più leggiero, la seconda costituisce il secondo vaccino.

Per la preparazione di tali polveri vaccinanti si conoscono del resto varie modificazioni.

Per inoculare queste polveri, se ne scioglie una piccola quantità in poca acqua sterile, poi si filtra, ed il filtrato s'inocula sotto cute nella punta dell'orecchio o della coda. Il secondo vaccino viene inoculato pochi giorni dopo il primo.

Quali siano gli anticorpi che si producono con la vaccinazione e che stabiliscono l'immunità non si conosce. Sappiamo soltanto che i sieri degli animali immunizzati hanno potere agglutinante specifico, in diluzioni variabili da 1:300 a 1:6000; anche il siero dei bovini malati agglutina in diluzioni prossime a 1:800.

Con vari mezzi d'immunizzazione, Kitt dalla pecora e dal cavallo, Arloing dal vitello, Leclainche e Vallée dal cavallo e dalla capra, ottennero sieri poco efficaci in generale; e neppure il siero ottenuto da Grassberger e Schattenfroh, inoculando nel vitello il loro potente veleno, ha nella pratica sortito buoni effetti, sebbene siasi nella cavia dimostrato provvisto di forte potere antitossico.

Isolamento e identificazione.

Per isolare questo germe dai tessuti animali che lo contengono in coltura pura, basta seminare un po' di succo muscolare o di liquido edematoso in agar zuccherato per infissione, e poi provvedere all'anaerobiosi, prima di collocare i tubi in termostato.

Se però insieme al germe che si vuole isolare, altri ve ne sono anaerobi assoluti o facoltativi, bisogna ricorrere alle colture per agitazione

o alle colture a piatto col metodo della plastilina (v. p. 1269). Nella pratica il caso più frequente è appunto il secondo.

Una volta isolato, il bacillo del carbonchio sintomatico, si può riconoscere facilmente da quello del tetano già per i suoi caratteri microscopici, specialmente nello stadio di sporificazione: in ogni modo l'esperimento negli animali può sempre concedere un giudizio diagnostico sicuro, anche quando non siano evidenti i caratteri differenziali nelle colture.

Più difficile è la diagnosi rispetto al B. dell'edema maligno: vedremo, nel capitolo destinato a questo germe, quali sono i criteri più importanti.

Bacillus oedematis maligni

o *Vibrione settico di Pasteur*, *B. dell'edema maligno.*

Fu scoperto da Pasteur nel 1887.

È causa della cancrena fulminante, dell'edema acuto purulento e dell'edema maligno dell'uomo e degli animali domestici. Si trova, oltre che negli animali malati, anche molto diffuso nel terreno e nelle acque sporche.

Caratteri microscopici.

Bastoncini diritti, con estremità arrotondate, delle dimensioni di 0.6-1 × 3.5 μ, mobili, con una corona di 20-40 ciglia, ben colorabili, poco o punto resistenti al Gram.

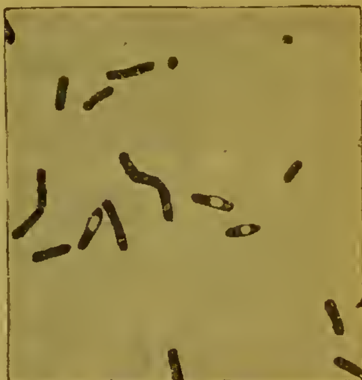


Fig. 533. — B. dell'edema maligno.

Nelle colture si trovano quasi soltanto bacilli isolati o riuniti in file di 2, 3 o 4 al più, e pochissimi filamenti, non però molto lunghi; negli umori degli animali infetti si presentano frequentemente sotto forma di filamenti e di lunghe catene, composte d'individui disuguali. Il movimento di questi germi ha carattere serpiginoso.

Le spore, che si formano rapidamente così nelle colture come nei cadaveri, hanno forma ellittica, dimensioni di 1.5 × 2 μ, posizione mediana, più raramente terminale: i bacilli che le contengono sono rigonfiati in forma di fuso, ossia a clostridio (v. fig. 533).

Colture.

Le condizioni di sviluppo sono le stesse già dette per il B. del tetano e per il B. del carbonchio sintomatico; il minimo di temperatura è intorno a 15°.

Tutte le colture hanno caratteri quasi identici con quelle del B. di Chauvœu, salvo che le colonie dànno propaggini più ricche, e tutte le colture in provetta crescono più rigogliose e con maggiore produzione di gas: la gelatina viene fluidificata più rapidamente e quasi interamente, onde in ultimo si vedono al fondo della provetta accumuli di colonie globulari (v. fig. 534).



Fig. 534. Aspetto terminale di una infissione in gelatina del B. dell'edema maligno.

Attività biochimiche.

Il B. dell'edema maligno produce idrogeno solforato ed ammoniaca. Scindendo il glicosio ed il saccarosio produce alcool etilico, molto acido lattico, per lo più inattivo, e poco acido butirrico. Non attacca il lattosio, onde la coagulazione del latte avviene con reazione permanentemente anfotera, quindi per azione enzimatica. Alcuni stipiti sciolgono il coagulo formato, e sono quelli appunto che hanno maggior potere putrefattivo.

Annerisce i terreni contenenti poltiglia cerebrale.

I gas prodotti da questo germe sono acido carbonico e idrogeno, oltre all'idrogeno solforato e all'ammoniaca già ricordati e ad altre sostanze che impartiscono alle colture un puzzo ripugnante, non di rado urinoso.

Azione patogena.

La virulenza del germe diminuisce di solito nelle colture, ma si può esaltare mediante successivi passaggi da cavia a cavia.

La cavia ed il topo sono straordinariamente recettivi; recettivo è anche il coniglio, benchè in grado minore; inoltre i vitelli, i cavalli, le pecore, le capre ed i piccioni. Quasi refrattario è il ratto grigio.

Adoperando colture virulente, basta inocularne $^1/_{100}$-$^1/_{400}$ di goccia sotto cute in una cavia per ucciderla in poche ore. Alla sezione si nota nel punto inoculato un edema tanto più esteso e intenso, talora soffuso di sangue, quanto più tardiva è sopravvenuta la morte; i muscoli vicini sono imbevuti di siero ed hanno aspetto di prosciutto; il connettivo è disteso da bollicine di gas fetidi; nel peritoneo vi è del liquido torbido più o meno abbondante, che contiene molti bacilli assai lunghi e disuguali (v. fig. 535); il fegato è pallido, la milza molle e friabile.

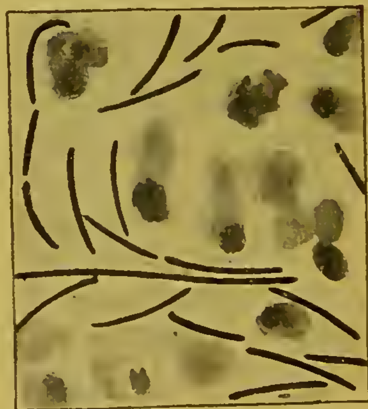


Fig. 535. — Bacilli dell'edema maligno nell'essudato peritoneale della cavia.

I bacilli si trovano nell'edema sottocutaneo e nel siero che imbeve i muscoli prossimi al punto d'inoculazione, come anche numerosi tro-

vansi nel liquido peritoneale; nel sangue raramente trovansi prima che avvenga la morte dell'animale, ma dopo questa vi passano rapidamente. Così pure la sporificazione non si compie mai mentre che l'animale è in vita.

Veleni.

I non pochi tentativi fatti per ottenere un veleno dalle colture di questo germe, ci hanno fatto conoscere che esso ha ben deboli proprietà tossiche; infatti sia i filtrati della sierosità degli animali morti di edema maligno, sia quelli di colture in terreni speciali, come per esempio in poltiglia di carne mescolata con una soluzione alcalina, devono essere inoculati in quantità di parecchi cmc. in un animale così recettivo come la cavia per ottenerne la morte.

Azione antigena.

Riesce abbastanza facilmente l'immunizzazione della cavia e del coniglio, inoculando loro più volte sia filtrati di colture liquide, sia colture uccise a 115°.

Immunizzando l'asino con iniezioni prima intravenose, poi intramuscolari, di sierosità raccolta da animali infetti, Leclainche ottenne un siero che nella quantità di 2 cmc. proteggeva la cavia contro l'iniezione di cinque gocce di sierosità virulenta.

Tale siero inoltre dimostrava potere agglutinante specifico in diluzioni di 1 : 30-1 : 30000.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento del B. dell'edema maligno si fa seguendo le stesse norme indicate per il bacillo del carbonchio sintomatico. Per differenziare fra loro questi due germi, si può tener sotto occhio la seguente tabella:

Caratteri	B. del carbonchio sintomatico	B. dell'edema maligno
Resistenza al Gram.	+	±
Dimensioni e aggruppamenti dei bacilli	brevi; rare catene cortissime di elementi uguali	lunghi; filamenti o lunghe catene di elementi disuguali
Odore delle colture in agar con siero	poco fetido	fetidissimo
Odore del gas sotto cute nella cavia inoculata	di burro rancido	fetidissimo
Azione patogena per il coniglio .	assai rara e debole	costante
Produzione di alcool nei terreni zuccherati	—	+

Bacillus botulinus
o *B. del botulismo.*

Fu scoperto da van Ermengem nel 1896 in una piccola epidemia di intossicazione da carne in Ellezelles nel Belgio, e precisamente in forma sporale, sia nel prosciutto che avea cagionato la malattia, sia nella milza di una persona che ne era morta. Fu poi ritrovato un'altra volta da Römer in un campione di carne salata, e da Kempner e Pollak nelle feci dei maiali.

Caratteri microscopici e colturali.

Bastoncini diritti delle dimensioni di 0.9-1.2 × 4-9 μ, provvisti di movimento torpido, con 4-9 ciglia, ben colorabili anche col metodo di Gram. Le spore sono ellittiche, per lo più terminali.

È anaerobio stretto; cresce nei comuni terreni purchè siano bene alcalini; l'ottimo di temperatura è 18°-25°.

Le colture somigliano a quelle del B. del tetano.

Le colonie in gelatina sono circondate da una corona di propaggini a guisa di aculei, la quale poi scompare, dando luogo ad un margine irregolare, profondamente dentellato o seghettato. Fluidifica la gelatina, scinde il glicosio con forte produzione di gas, non attacca il saccarosio nè il lattosio, non coagula il latte.

Le colture tramandano un odore di burro rancido, specialmente quelle in brodo; mai odore di putrefazione.

Azione patogena.

Sono recettivi i topi e le cavie, meno i conigli, ancor meno i ratti e i piccioni, poco i cani, i gatti e i polli.

Il germe introdotto per la bocca o sotto cute negli animali recettivi produce i sintomi caratteristici del botulismo, senza moltiplicarsi. Lo stesso effetto ha l'inoculazione dei filtrati di brodocolture. Alla sezione degli animali non si riscontrano lesioni importanti.

Questo germe agisce per mezzo di un potente veleno, che è una esotossina e con la quale immunizzando degli animali si è potuta ottenere un'antitossina specifica.

Fra i sintomi dell'intossicazione botulinica prevalgono quelli del sistema nervoso. Si hanno dunque midriasi, disturbi dell'accomodazione, afonia, paresi della lingua e del faringe, raramente dell'estremità; disturbi secretori, consistenti per lo più in aumento della saliva e del muco bronchiale; tosse crupale; soppressa l'eliminazione dell'urina, della bile e delle feci. La sensibilità è conservata; non vi è febbre. In ultimo sopravviene la paralisi dei muscoli respiratori e la morte.

Bacterium abortus epizootici

o *B. dell'aborto epizootico delle vacche.*

Fu scoperto nel 1897 da Bang, che lo vide abbondante nell'essudato giallastro che si forma fra l'uovo e la mucosa uterina.

Sono batteri piccolissimi, ellittici, press' a poco grandi come quelli delle setticemie emorragiche, ben colorabili, non però col metodo del Gram: alcuni elementi sono piuttosto lunghi, perfino quanto il B. della tubercolosi. Nelle forme ellittiche vi sono uno o due granuli, nelle forme più lunghe perfino tre, che si tingono più intensamente: spesso hanno posizione polare. Si trovano elementi liberi; ma per lo più sono accumulati in gran numero nel protoplasma delle cellule contenute nell' essudato.

L'isolamento riesce in un terreno composto di parti eguali di agar, di gelatina e di siero. L'agar e la gelatina si mescolano prima; quando la temperatura della miscela è discesa a 45°, vi si aggiunge il siero: subito dopo si semina un po' di essudato nel primo tubo, e da questo si fanno varie diluzioni in altri tubi (v. p. 1270), il cui contenuto si fa prontamente solidificare, sottoponendolo ad una corrente di acqua fredda. I tubi si pongono a 37°, che è l'ottimo di temperatura.

Una volta sviluppate le colture nei cilindri nutritivi, se ne fa la pesca ed il trapianto secondo le regole indicate a p. 1278.

Il B. dell' aborto epizootico si sviluppa nei cilindri di agar-gelatina con siero in modo caratteristico. Le colonie si vedono tutte in un tratto alto 1-1.5 cm., il cui limite superiore si trova mezzo cm. più basso della superficie del cilindro. Sopra e sotto al tratto cosparso di colonie non si vede traccia di sviluppo. Dalle ricerche di Stribolt risulta che questo comportamento singolare dipende dal fatto che il germe non tollera la concentrazione del 21 % di ossigeno, perciò non nasce nello strato superiore del cilindro; ma che non tollera neppure concentrazioni di troppo minori, quindi non nasce nel tratto inferiore del cilindro.

Bang ha d'altra parte dimostrato che il suo bacillo può crescere benissimo in un'atmosfera quasi tutta di ossigeno. Sicchè bisogna conchiudere che questo germe ha due ottimi per ciò che concerne i suoi rapporti con l'ossigeno, uno rappresentato da una concentrazione di poco inferiore al 100 %, l'altro da una concentrazione di poco inferiore al 21 %.

Il B. di Bang cresce anche in brodo glicerinato al 5 % con o senza aggiunta di siero. Per coltivarlo in questo liquido, dopo averlo seminato, si richiude la provetta col tappo cosparso di una soluzione di pirogallolo; sopra al tappo si versano poche gocce di una soluzione di potassa, e poi si paraffina la bocca della provetta, oppure la si copre con un cappuccio di gomma. Lo sviluppo è lento; ma già dopo 5-6 giorni si vede al fondo un tenue sedimento biancastro, finamente granuloso: più tardi il li-

quido può anche presentare un lievissimo intorbidamento nella parte inferiore.

Bang ha dimostrato l'azione patogena del suo germe inoculandone delle colture pure nella vagina di vacche e di pecore pregne, le quali abortirono, eliminando un essudato caratteristico ricco di germi specifici.

III. — SPIRILLACEE.

Le spirillacee sono tutte forme curve, precisamente spirali o segmenti di spirali, e sono tutte mobili, quindi ciliate. Vi si comprendono due generi: *Vibrio*, formato di mezza spira, e *Spirillum*, formato di una o più spire. Al secondo genere non appartengono germi patogeni, al primo appartiene il V. del colera asiatico, il V. di Metschnikoff ed altri ancora, fra cui molti colerasimili (Sanarelli).

Vibrio cholerae asiaticae

o *Vibrione del colera, B. virgola.*

Fu scoperto da Koch nel 1882, ed è causa del colera asiatico.

Si riscontra nelle deiezioni; qualche volta è stato dimostrato anche nel vomito, non mai nel sangue dei colerosi.

Si trova anche nelle feci dei convalescenti e guariti di colera, per una durata che va da pochi giorni a 2-4 settimane, perfino a 2-3 mesi (emuntori di vibrioni).

In tempi di epidemia trovasi, con varia frequenza, anche nelle feci di persone sane che non hanno sofferto nè soffriranno forse di colera (portatori): per lo più esse provengono da ambienti dove si sono manifestati casi di colera.

Caratteri microscopici.

Il vibrione del colera (v. fig. 536) è largo 0.5-0.6 μ, lungo 1.5-3 μ, è curvo, con estremità arrotondate, talora leggermente affilate: è asporogeno, monociliato, mobilissimo, facilmente colorabile, non resistente al metodo del Gram.

Le dimensioni indicate rappresentano una media; vi sono stipiti più lunghi, e stipiti cortissimi, secondo le varie epidemie; inoltre per uno stesso stipite le dimensioni possono variare secondo il sostrato di coltura.

La forma curva non è di tutti gli individui, parecchi dei quali anzi appaiono diritti come semplici bastoncini, forse perchè sono rimasti fissati al vetrino con la curvatura perpendicolare ad esso. Ma non sempre questa

è la ragione: vi sono degli stipiti di vibrioni che presentano per loro natura elementi rettilinei o quasi, in grandissima prevalenza.

Almquist ha osservato che il V. del colera, in certe condizioni, produce in uno de' suoi poli un corpicciuolo rotondeggiante, che egli interpreta come artrospora. Tale interpretazione non è accettata dalla maggior parte dei batteriologi.

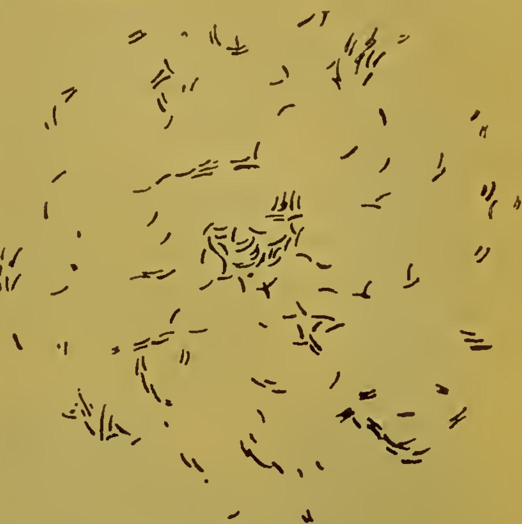


Fig. 536. — V. del colera da coltura.

Sono stati descritti de' vibrioni con due o più ciglia, come anche qualche stipite che non ne possedeva. Essendo troppo scarse queste asserzioni, devesi accettare il dato universalmente riconosciuto che il V. del colera ha un ciglio solo, posto ad un polo. Si possono bensì vedere alcuni elementi con due ciglia, uno per polo, ma si tratta verosimilmente di individui prossimi a dividersi.

Per colorare i vibrioni è bene adoperare la soluzione di Ziehl allungata con acqua distillata nel rapporto 1:4: la colorazione si fa bene a freddo, ma si agevola riscaldando sulla fiamma fino ai primi vapori il preparato, coperto con poche gocce di liquido colorante.

I vibrioni appaiono isolati, o riuniti a due a due in forma di S, o in forma di parentesi accoppiate con la convessità opposta o concorde; talora si uniscono in catene, in cui i singoli individui sono disposti con le convessità alternatamente a destra e a sinistra (aggruppamenti o forme spirillari). Nelle deiezioni dei colerosi, più propriamente nei caratteristici fiocchetti mucosi, i vibrioni si possono presentare in accumuli fascicolari.

Colture.

Il V. del colera cresce bene in tutti i comuni terreni di coltura, fra 12° e 40°, con l'ottimo a 37°. Predilige una reazione bene alcalina; è aerobio.

Colonie in agar. — Le colonie superficiali di 18-24 ore sono rotondeggianti, leggermente rilevate, di color grigiochiaro o grigiobiancastro, di aspetto umido, trasparenti o semitrasparenti, con riflessi cerulei, talora con accenno d'iridescenza. A piccolo ingrandimento mostrano contorno regolare e liscio, colore giallo chiaro, struttura punteggiata o finamente granulosa.

Le colonie profonde hanno forma di cote, o rotondeggiante più o meno irregolare, margine liscio o un po' anfrattuoso, colore giallastro, struttura granulosa.

Colonie in gelatina. — Colonie piccole, rotonde, grigie, grigio biancastre o grigio giallastre, che dopo 24-36 ore sono circondate da un alone

di fluidificazione, e poichè questo avviene anche sotto di esse, appaiono anche un po' approfondate. Via via che la fluidificazione avanza, l'approfondamento diviene maggiore, mentre l'alone liquido da chiaro si fa torbido perchè gli orli della colonia vi diffluiscono. Spesso, col tempo, intorno all'alone di fluidificazione si forma un anello concentrico di moltiplicazione batterica: le colonie assumono allora aspetto di bersaglio.

A piccolo ingrandimento appaiono lucenti, di color giallo chiaro, di struttura grossolanamente granulosa, con margini più o meno sbriciolati. Col passare del tempo, cioè dopo 36-48 ore, la granulosità comincia ad aumentare, sicchè viene un momento che ogni colonia appare composta di piccolissime particelle che riflettono fortemente la luce, come se fosse cosparsa di frammentini di vetro pesto. Via via che la fluidificazione cresce, quest'aspetto caratteristico si va estinguendo; il margine della colonia si disgrega e si sparge nella gelatina liquefatta, così che in ultimo ne risulta un insieme di grumetti sospesi irregolarmente nel disco di fluidificazione (v. fig. 537, colonie a destra in alto e in basso). Talvolta però in seno a questo le colonie rimangono compatte senza disfarsi (v. fig. 537, colonia a sinistra in basso). Si possono anche avere colonie abnormi, in forma di rosetta (v. fig. 537, colonia a sinistra in alto).

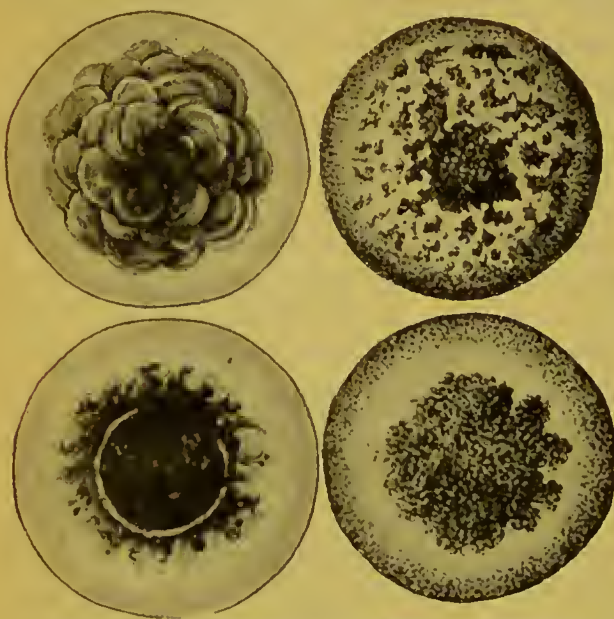


Fig. 537. — Colonie del V. del colera in gelatina. A sinistra in alto colonia di 5 giorni, abnorme, a rosetta: in basso altra colonia abnorme, di 6 giorni; a destra in alto colonia tipica di 8 giorni; in basso colonia tipica di 5 giorni.

Coltura in brodo. — Intorbidamento uniforme piuttosto forte; sedimento biancastro fioccoso al fondo; pellicola continua, grigiastra, sottile, talvolta rimontante sulle pareti della provetta. È però da avvertire che le colture di recente isolamento spesso non dànno la pellicola e che vi sono perfino degli stipiti che ordinariamente non la dànno quasi mai, neppure dopo essere da lungo assuefatti ai terreni artificiali.

Strisciamento su agar. — Patina continua, uniforme, liscia, mediocremente spessa, semiopaca, talora con riflessi cerulei, umida, con margini regolari.

Acqua di condensazione simile alla brodocoltura, quindi anche con pellicola.

Infissione in gelatina. — Nastrino continuo, grigiobiancastro: nelle colture di 24-36 ore si vede alla superficie un piccolo infossamento della

gelatina in forma di bolla; nelle colture di età più avanzata, mentre la bolla d'aria lentamente ingrandisce, il sostrato sotto di essa viene fluidificandosi in forma di coppa (v. fig. 538).

In questo periodo la coltura è caratteristica; ma poi la fluidificazione procede in forma d'imbuto e può finire in forma di cilindro, mentre la soprastante bolla d'aria scompare del tutto. La gelatina liquefatta è torbida e contiene finissimi grumetti.



Fig. 538. Infissione di V. del colera in gelatina.

Coltura in latte. — Il vibrione del colera cresce nel latte, per lo più senza coagularlo: vi sono però degli stipiti che producono tale modificazione, secondo alcuni per l'acido lattico risultante dalla scissione del lattosio, secondo Sclavo per opera di un enzima. Il *V. romanus* isolato da Celli e Santori nell'epidemia del 1893 non coagulava mai il latte.

Strisciamento su patate. — Sulla patata acida il vibrione del colera in genere cresce male. Sulla patata alcalinizzata dà una patina biancastra o biancogiallastra, poco rilevata, untuosa, con margini non precisamente distinti; col tempo la patina si espande, acquistando un colore giallobruno.

Attività biochimiche.

Il vibrione del colera produce indolo, di solito in gran quantità: e siccome esso riduce anche in nitriti i nitrati del peptone, così la presenza dell'indolo può dimostrarsi con la semplice aggiunta di acido solforico: questa è la così detta reazione del rosso colerico.

Produce molto idrogeno solforato. Attacca il glicosio, il saccarosio, il lattosio, producendo acido lattico levogiro, non mai gas.

Singolare è il comportamento del germe in siero di latte con laccamuffa: la pellicola che si forma in superficie è azzurra, lo strato sottostante è rosso, tutto il resto è scolorato. Ciò vuol dire che in immediato contatto dell'ossigeno atmosferico è più facile la scissione delle sostanze proteiche con produzione di alcali: che in difetto di ossigeno si compie meglio la scissione del lattosio e la conseguente produzione di acidi: e che inoltre il vibrione del colera ha un'azione riducente sulla laccamuffa.

Le colture di questo germe emanano un odore sgradevole, non ben definibile.

Azione patogena.

Il vibrione del colera è patogeno per la cavia, il coniglio, lo spermofilo.

Lo spermofilo, infettato per ingestione di colture pure, ammala con un quadro sintomatico ed anatomico simile a quello del colera umano.

Lo stesso può ottenersi sperimentando nello stesso modo in giovani conigli, in giovani cavie ed in gatti poppanti. Nella cavia adulta invece è difficile ottenere simili effetti.

Movendo dal concetto che il succo acido dello stomaco può danneggiare i vibrioni, quindi toglier loro la vita o la virulenza prima di giungere nell'intestino tenue, loro sede di predilezione, Koch somministrava alle cavie prima 5 cmc. di una soluzione di carbonato sodico al 5 % e poco dopo introduceva nello stomaco 10 cmc. di brodocoltura, e nello stesso tempo 1-1.5 cmc. di tintura d'oppio nel peritoneo allo scopo di sedare i movimenti dell'intestino. Con tale espediente Koch riuscì a far morire la cavia in 24 o 48 ore con fenomeni di paresi ed ipotermia: alla sezione l'intestino si mostrava iperemico e diguazzante per copioso liquido biancastro contenente cellule e lembi di cellule epiteliali, e numerosi vibrioni.

Per iniezione intraperitoneale le cavie muoiono in 12-24 ore, ed alla sezione si trova nella cavità addominale una certa quantità di liquido contenente pochi o molti vibrioni vivi, secondo la quantità della coltura inoculata.

La virulenza del vibrione del colera è assai variabile già fin dall'isolamento; diminuisce notevolmente nelle colture artificiali. Si può esaltare la virulenza diminuita, coltivando il germe in uovo di pollo, oppure in acqua peptonata al 2 % contenente il 3 % di nitrato potassico.

Ricordiamo anche come nell'uomo siansi riprodotte forme leggiere e di media gravezza di colera per ingestione di colture pure (Pettenkofer ed Emmerich); così pure sono avvenuti casi di colera mortale consecutivo ad ingestione di piccole quantità di coltura in persone di laboratorio.

Veleni.

I filtrati di brodoculture invecchiate hanno potere tossico, non però molto forte; più attivi sono i corpi batterici cresciuti su agar ed uccisi o col cloroformio o col calore. L'inoculazione dei vibrioni morti nel peritoneo ha lo stesso effetto dei vibrioni vivi : stadio algido, astenia muscolare, prostrazione, ipotermia.

Da alcuni stipiti di vibrioni del colera, coltivati in brodo peptonato alcalino, si è potuto ottenere già dopo 5-7 giorni d'incubazione un veleno solubile, che si attenuava fortemente pel riscaldamento a 70°, e nella quantità di mezzo cmc. inoculato nelle vene uccideva in poche ore il coniglio e la cavia (Brau e Denier, Kraus e Russ). I risultati di queste esperienze richiamano alla mente quelle già fatte da Metschinikoff, Roux e Salimbeni, i quali, ponendo nel peritoneo delle cavie sacchetti di collodio contenente acqua peptonata seminata di vibrioni, osservarono la morte degli animali in capo a 3-5 giorni; ciò vuol dire che dei veleni solubili erano passati attraverso la membrana di collodio.

Ransom invece, filtrando colture liquide di 5-10 giorni, dopo averle riscaldate a 100°, e precipitando il filtrato con alcool, ottenne una sostanza che in quantità di pochi centigrammi uccideva le cavie. Il vibrione del colera avrebbe dunque una endotossina cottostabile, ed incostantemente una esotossina termolabile.

Però bisogna avvertire che i fenomeni di intossicazione colerica nell'uomo, forse anche negli animali, almeno in parte, possono essere dovuti a veleni relativamente semplici, derivanti dall'azione enzimatica dei vibrioni sulle sostanze proteiche, e propriamente sul peptone, con formazione di tossopeptidi. Questo concetto trova una conferma indiretta in alcune ricerche fisico-chimiche fatte nel siero dei colerosi da Segale, il quale vi ha riconosciuto un aumento di sostanze osmoticamente e refrattometricamente attive, senza che vi corrispondesse un adeguato aumento di elettroliti dissociati: identiche modificazioni si riscontrano nell'intossicazione peptonica.

Dalle colture di vibrioni del colera si possono ottenere anche, secondo il metodo di Lustig e Galeotti, dei nucleoproteidi, i quali hanno un'azione tossica generica, oltre a quella antigena specifica di cui sarà parlato nel prossimo paragrafo.

Qualche stipite di vibrione del colera produce delle emolisine, la cui azione si dimostra sulle emazie del coniglio e del capretto: questa asserzione è però impugnata da Kraus, il quale afferma essere il vero vibrione del colera sempre sprovvisto di potere emolitico. In tal proposito ricordiamo i così detti stipiti El-Tor, che Crendiropoulo isolò dalle feci di pellegrini malati di dissenteria, reduci dalla Mecca, e che secondo lui, come anche secondo Gotschlich ed altri, sono veri vibrioni colerigeni, mentre secondo Kraus non sono che colerasimili. Per il vibrione del colera è stato dimostrato anche uno spiccato potere aggressinico.

Azione antigena.

Il vibrione del colera ha forti proprietà antigene. Si possono immunizzare gli animali, principalmente i conigli e i capretti, inoculando sia colture vive, sia morte. Nel siero di questi animali si dimostrano agglutinine e batteriolisine specifiche, in forte concentrazione: si ottengono facilmente sieri agglutinanti con titolo di 1:5000-10000 e più, e sieri batteriolitici capaci di dissolvere dosi minime letali di agarcoltura nella diluzione di 1 : 2000-1 : 5000.

L'importanza pratica delle agglutinine e delle batteriolisine è generalmente ristretta alla diagnosi specifica dei vibrioni, come vedremo più oltre. Levi Dalla Vida ha fatto però delle ricerche, dalle quali risulta che gli individui sani eliminatori di vibrioni possono distinguersi in malati pregressi ed in portatori, secondo che il loro siero agglutina o no i vibrioni del colera.

Un siero batteriolitico inoculato in dose determinata, ma sempre piccolissima, insieme con dieci dosi minime letali di coltura virulenta, nel peritoneo di una cavia, produce la dissoluzione dei vibrioni e salva l'animale dalla morte. Se il siero s'inocula un'ora e mezzo dopo l'infezione, la dissoluzione dei vibrioni avviene pure, benchè più lentamente, ma l'animale soccombe, perchè i germi precedentemente inoculati hanno avuto tempo di moltiplicarsi in modo che i veleni risultanti dal disfacimento di essi, per opera del siero inoculato in secondo tempo, raggiungono una dose sicuramente mortale. Se poi l'iniezione del siero si fa dopo due ore e mezzo, non solo l'animale soccombe, ma anche il fenomeno della batteriolisi è ridotto al minimo.

Già da questi fatti, fondamentalmente accertati da Pfeiffer, appare probabile che nell'uso terapeutico di tali sieri in una malattia con decorso rapidissimo come è il colera, vi è da riporre ben debole speranza: una qualche efficacia potrebbe avere nei casi colti sul primo inizio del periodo prodromico. La morte per colera essendo dovuta ad un intossicazione, i sieri curativi devono avere essenzialmente proprietà antitossiche. Immunizzando degli animali con l'uno o l'altro dei prodotti tossici già ricordati, si è cercato di ottenere sieri antitossici, de'quali parecchi tuttavia si sono dimostrati in generale non molto attivi. Kraus immunizzò degli animali con filtrati di brodocolture di otto giorni, quindi con una vera tossina solubile, ed ottenne un siero antitossico, capace di neutralizzare l'esotossina e l'endotossina colerica, e di manifestare anche azione curativa nelle cavie e nei topi infettati. Il siero ottenuto da Salimbeni, e che è stato già adoperato nella pratica, anch'esso ha essenzialmente proprieta antitossiche.

Mentre la sieroterapia anticolerica è ancora all'inizio, è già stata contro il colera, in diversi luoghi di epidemia, usata da tempo la vaccinazione (v. Vol. II, pag. 1114). In vece di vaccini preparati con colture intere, Bertarelli ha sperimentato che si possono adoperare con vantaggio gli autolizzati ottenuti col metodo di Neisser e Shiga (v. p. 1302).

Isolamento.

L'isolamento e la consecutiva identificazione del vibrione del colera hanno un'importanza pratica di primissimo ordine; la diagnosi batteriologica del colera costituisce l'indicazione precisa per l'attuazione di ogni misura profilattica.

Prelevamento del materiale da esaminare. — Circa 50 cmc. di deiezioni del malato o del convalescente o del sospetto portatore si raccolgono in vasi di vetro con pareti robuste e con tappo smerigliato, precedentemente sterilizzati mediante l'ebollizione per 10', *non mai con antisettici.* È anche da evitare l'iniezione rettale di glicerina allo scopo di ottenere una scarica alvina dai convalescenti o dai portatori, poichè

in presenza di glicerina i vibrioni che possono trovarsi nelle feci periscono (Gosio), rendendo così vana ogni ricerca.

I recipienti vanno coperti di carta pergamenacea, e muniti di un cartellino con le indicazioni del contenuto, del nome del malato, della data di raccolta, ecc.; poi, chiusi in robusta cassettina di legno e ben condizionati per mezzo di ovatta, segatura di legno o altro di simile, possono essere senza pericolo trasportati o spediti.

Quando la raccolta delle deiezioni non può essere fatta nei recipienti di vetro, si può ricorrere ai batuffoli d'ovatta, ricordati a p. 1259, che si sporcano abbondantemente con le deiezioni che si trovano in vasi o su biancheria. Il condizionamento e il trasporto di tali batuffoli va fatto però sempre secondo le norme fondamentali testè enunciate.

Per raccogliere il materiale d'esame *dal cadavere*, la sezione dev'essere fatta subito dopo la morte, e limitata all'apertura dell'addome ed all'estrazione di tre anse dell'intestino tenue: di questo si tagliano, dopo fatte le necessarie legature doppie, tre pezzi lunghi ciascuno 15 cm., uno dalla parte mediana dell'ileo; l'altro due metri al di sopra della valvola ileocecale; il terzo, che è il più importante, appena al di sopra di questa valvola. I tre pezzi si chiudono in vasi di vetro con largo collo e tappo smerigliato, sterilizzati.

Se il materiale raccolto, sia dal vivente, sia dal cadavere, dev'essere trasportato lontano, in modo che non possa giungere in laboratorio prima che siano trascorse parecchie ore, conviene anche allestire subito dei preparati a strisciamento: a tale scopo bisogna porre e distendere con una spatolina metallica alcune gocce di feci, o meglio dei fiocchettini mucosi, se ve n'è, sopra dei coprogetti, che si essiccano e si fissano alla fiamma: indi s'involgono in carta bibula, si chiudono dentro scatolini, poi si proteggono con ovatta e si pongono nella stessa cassetta destinata ai campioni delle feci in barattoli.

Il materiale giunto in laboratorio si sottopone alle seguenti ricerche, le quali insieme costituiscono il

Metodo classico. — Consiste nell'esame microscopico diretto delle feci e nella semina di esse in un terreno di selezione, quale è l'acqua peptonata (v. p. 1257).

Esame microscopico. Per fare quest'esame bisogna distendere su vetrini coproggetti qualche fiocchettino mucoso, oppure una piccola quantità delle deiezioni sospette: i preparati si colorano secondo le regole generali (v. p. 1232) con liquido di Ziehl diluito in 4 parti di acqua distillata.

È utile anche fare qualche preparato in goccia pendente, diluendo prima convenientemente il materiale in acqua peptonata.

L'esame microscopico non può fornire altro dato che questo, la presenza di vibrioni: questi possono essere del colera, ma possono anche non essere.

Colture. a) Nel caso che si tratti di *malati sospetti colerosi.*

1. Si seminano in 3-6 tubi contenenti ciascuno 10 cmc. di acqua peptonata altrettanti fiocchettini mucosi o, se questi mancano, porzioncine di feci, e si pongono a 37°.

2. Si allestiscono tre colture a piatto in gelatina, ed altrettante in agar col metodo delle diluzioni (v. p. 1262): le prime si pongono a 22°, le seconde a 37°.

È meglio, sempre che si può, fare due serie di piastre in gelatina e due serie in agar.

3. Aspettando che nelle colture a piatto crescano delle colonie bene evidenti, si osservano dopo 6-8-12 ore le colture in acqua peptonata, massime quelle che eventualmente presentino già l'accenno di una pellicola in superficie. Se questa non c'è, non monta; si preleva lo stesso un'ansa di liquido alla superficie, e se ne fa un preparato colorato; se occorre, con un'altra ansa si allestisce una goccia pendente. Se nei preparati si riscontrano parecchi vibrioni, si fanno colture a piatto in gelatina e in agar; se pochi, è bene anche fare ulteriori passaggi in acqua peptonata.

È vantaggioso adoperare l'acqua peptonata agarizzata in vece dell'ordinario agar preparato col brodo: seminando le feci in acqua peptonata e dopo 6-8 ore facendo i trapianti in agar preparato con acqua peptonata, si riesce non di rado ad avere in 12-14 ore colture pure adoperabili per la reazione di Gruber, come lo scrivente ha avuto occasione di sperimentare.

4. Si osservano le colonie cresciute nelle piastre dopo 16-18 ore, e delle sospette si fanno trapianti per infissione in gelatina e strisciamento su agar, oltre che in brodo e in acqua peptonata.

Appena sviluppate queste colture d'isolamento, e riconosciutane la purezza e la concordanza dei caratteri con quelli noti del vibrione del colera, compresa naturalmente la reazione indolnitrosa (v. p. 1292), si procede all'identificazione.

b) Nel caso che si tratti di *convalescenti* o *sospetti portatori* si procede in sostanza come è stato detto sotto *a*); però:

1. Si possono omettere l'esame microscopico e le colture a piatto allestite direttamente dalle feci.

2. L'arricchimento si fa stemperando 1 cmc. di feci in 50 cmc. di acqua peptonata, contenuta in matraccio o in cilindro: una volta sviluppata questa coltura, da essa poi si allestiscono tutte le altre (metodo Schottelius).

3. L'esame dev'essere fatto almeno due volte con le feci dei casi sospetti, e tre volte con quelle dei convalescenti, ad intervalli di 2 giorni, meglio di 4-5 giorni, prima di asserire un reperto negativo.

Accade qui di fare un avvertimento: che nelle feci dei convalescenti possono non essere dimostrabili, in esami ripetuti più volte, i vibrioni del colera, eppure questi essere presenti ancora nel loro intestino: onde

la ricerca batteriologica in tali casi dovrebbe essere ripetuta dopo la somministrazione di un purgante salino, il quale provoca una facile eliminazione dei germi (Zirolia).

Identificazione.

Una volta isolato un vibrione, che dimostra i caratteri microscopici e colturali del vibrione del colera, se ne deve fare l'identificazione, per distinguerlo dai così detti vibrioni colerasimili, che non sono mai causa del colera, e che possono essere differenziati, si può dire quasi esclusivamente, per mezzo di reazioni biologiche specifiche, le quali sono due: l'*agglutinazione* ed il *fenomeno di Pfeiffer*.

1. *Agglutinazione.* — Il fenomeno dell'agglutinazione usato allo scopo di identificare il vibrione del colera, porta il nome di reazione di Gruber e Durham.

Per eseguirlo bisogna possedere un siero specifico agglutinante attivo almeno alla diluzione di 1:5000, meglio di 1:10000-1:20000.

Se ne preparano diluzioni in soluzione fisiologica in 4 rapporti, che corrispondano i primi tre al decuplo, al quintuplo, al doppio del titolo limite ed il quarto sia uguale allo stesso titolo limite, cioè alla massima diluzione di siero ancora attiva.

In un cmc. di ciascuna di queste diluzioni si stempera un'ansa di agarcoltura di 16-18 ore del vibrione sospetto.

È bene contemporaneamente fare le stesse prove con una coltura di sicuro vibrione del colera.

Per tutto il resto, come anche circa la maniera di osservare il fenomeno, v. p. 1317.

Si può asserire che il vibrione in esame è quello del colera quando si agglutina evidentemente, in capo ad un'ora, almeno nella diluzione di siero corrispondente al titolo limite, o al suo doppio, o almeno al suo quintuplo: con un siero del titolo 1 : 5000, per esempio, bisogna che il fenomeno avvenga, se non nelle diluzioni 1 : 5000 ed 1 : 2500, almeno in quella 1 : 1000. Il V. del colera, purchè si adoprino colture fresche e recenti, si fa sempre agglutinare dal siero allungato in questo rapporto (Pergola).

L'accennata restrizione è dovuta al fatto che si possono trovare, secondo alcuni, benchè rarissimamente, dei colerasimili che dànno reazioni di gruppo, le quali però non sono state mai osservate in siero agglutinante molto attivo, diluito nel rapporto 1: 1000. La diluzione massima nella quale un V. colerasimile può essere agglutinato dal siero anticolerico è 1: 500, secondo Zirolia.

D'altra parte però possono capitare vibrioni poco agglutinabili in primo isolamento: in tal caso il passaggio frequente di esso in coltura artificiale o nell'organismo animale è sufficiente a renderli più sensibili all'azione delle agglutinine specifiche.

2. *Prova di Pfeiffer*. — Questa non dovrebbe mai omettersi allorchè si tratta d'identificare il vibrione del colera nei primi casi di malattia sospetta che si manifestano in una regione. Tuttavia, poichè talvolta accade che veri vibrioni del colera si mostrino in principio pochissimo virulenti per la cavia, la prova non sempre può essere eseguita immediatamente in maniera da assicurare un buon successo; bisogna allora esaltare prima la virulenza dello stipite isolato.

Per eseguire la prova di Pfeiffer bisogna aver pronto un siero batteriolitico di alto titolo, tale almeno che nella quantità di 0.2 mgr., diluita in un cmc. di brodo, ed inoculata nel peritoneo di una cavia insieme con 10 dosi minime letali di un vibrione colerigeno sicuro molto virulento, ne produca la disgregazione granulare completa in un'ora, salvando l'animale dall'infezione.

L'esperimento si fa classicamente in 4 cavie, del peso medio di 200 gr.: in ciascuna di esse s'inocula nel peritoneo un cmc. di brodo contenente quantità precise del siero anticolerico e dei vibrioni sospetti presi da un'agarcoltura di 18 ore, secondo il seguente specchietto.

Cavia	Vibrioni sospetti	Siero
A	Un'ansa normale	specifico, in dose uguale al titolo limite
B	Id.	specifico, in dose quintupla del titolo limite
C	Id.	non specifico (*a*), in dose 50 volte maggiore di quella che rappresenta il titolo limite del siero specifico
D	Mezz'ansa normale	—

(*a*) Il siero non specifico deve provenire da un animale della stessa specie onde si è ottenuto per immunizzazione il siero specifico; se questo viene da un capretto, il siero non specifico sarà siero di capretto normale.

Dopo 20-30′ che si son fatte le inoculazioni, si fa un piccolo occhiello nella cute addominale di ciascuna cavia, e con una pipetta Pasteur sterilizzata si trapassa la sottile parete muscolare dell'addome per toglierne una goccia di liquido: le quattro gocce si osservano in cellette di Koch.

Dopo un'ora si fa altrettanto.

Si deve notare al microscopio se i vibrioni sono abbondanti o scarsi, mobili o immobili, agglutinati o liberi, disgregati in granuli o integri.

Nel caso che si tratti di un vero vibrione del colera, l'esito dello esperimento sarà questo:

nelle cavie *A* e *B* si svolgono le fasi note del fenomeno di Pfeiffer (v. p. 1420), sicchè dopo mezz'ora o un'ora nel liquido peritoneale non vi sono più vibrioni, ma soltanto pochissimi granuli risultanti dalla

loro disgregazione, essendo stati tutti gli altri granuli spazzati via dai fagociti;

nelle cavie *C* e *D* il fenomeno di Pfeiffer non avviene, e dopo mezz'ora o un'ora il liquido peritoneale brulica di vibrioni liberi ed integri;

la cavie *A* e *B* restano in vita; le cavie *C* e *D* soccombono.

Se il vibrione isolato non è quello del colera, manca il fenomeno di Pfeiffer, e tutt'e quattro le cavie sopravvivono, se il germe non è patogeno per la cavia, o per lo meno, se non è gran che virulento; muoiono tutt'e quattro, se il vibrione isolato è patogeno ed abbastanza virulento.

Come si vede, la prova di Pfeiffer è molto delicata, e ripetiamo che ad essa si ricorre, sempre che si tratti di formulare la diagnosi batteriologica di colera nei primissimi casi che si presentano.

Quando in una regione, già da qualche tempo, si sono verificati più casi di colera certo, la prova di Pfeiffer si omette, e l'identificazione resta affidata alla *prova di Durham e Gruber, la quale non va mai trascurata in alcun caso.*

Potere emolitico. — Kraus trovò che il vero vibrione del colera non ha mai potere emolitico sul sangue d'agnello o di capretto, mentre sono emolitici molti colerasimili.

Egli spinse le sue considerazioni al punto da asserire che questo del potere emolitico è un criterio diagnostico di prim'ordine. Se non che batteriologi sperimentatissimi videro che qualche stipite sicuro di vibrione del colera può avere azione emolitica, e di fronte a tali dati di fatto perde molto valore la proposta che fece Kraus di negare il carattere specifico colerigeno a qualsiasi vibrione che dimostri potere emolitico. Tuttavia se il criterio non ha valore assoluto, regge nel massimo numero dei casi; quindi può riuscire utile come complemento agli altri criteri, dai quali non bisogna mai scostarsi.

Potere tossico. – Kraus ed i suoi collaboratori poterono dimostrare che dei vibrioni isolati in casi di dissenteria, come quelli di El-Tor, ed altri ancora, che tutti per il criterio dell'agglutinazione dovevano essere considerati come colerigeni, producevano la tossina ad azione acuta, ricordata a p. 1594 Siccome Kraus d'altra parte non potè ottenere tal tossina da veri vibrioni colerigeni isolati in casi di colera, pensò che i primi tipi di vibrioni, non ostante la loro agglutinabilità specifica, non fossero veri vibrioni del colera, e che il criterio delle tossine ad azione acuta, insieme con quello del potere emolitico, potesse valere a differenziarli. Se non che tale asserzione era troppo assoluta, poichè abbiamo visto che veri vibrioni del colera, come quelli isolati in casi tipici di questa malattia a Saigon da Brau e Denier ed in Europa da altri autori, dànno anche tossine ad azione acuta.

Metodi speciali d'isolamento e identificazione.

Metodo Dieudonné. — Questo autore propose per l'isolamento del V. del colera il terreno speciale che porta il suo nome (v. p. 1253). Alla superficie dell'agar Dieudonné, solidificato in capsule Petri, si strisciano direttamente i fiocchetti mucosi, o particelle o gocce di feci; indi le piastre si pongono a 37°, e si osservano dopo 6-8 ore, e dopo 12 ore. Il V. del colera vi cresce rapidamente, dando colonie ben manifeste dentro lo spazio di tempo indicato, mentre gli altri germi esistenti nelle feci non si sviluppano ancora: è quindi in certo qual modo un terreno di selezione. La massa batterica delle colonie può quindi essere direttamente assoggettata, in goccia pendente, all'azione di un siero agglutinante, diluito secondo le norme già esposte (v. p. 1599).

Questo metodo è stato largamente usato, anche in Italia, con indiscutibile vantaggio. Gosio avverte che il suo pregio è quello di rendere possibile una diagnosi rapida e sicura in meno di 12 ore nei casi in cui le feci contengono molti vibrioni, quindi per l'accertamento dei casi sospetti; quando invece si tratta di convalescenti o di portatori, nelle cui feci i vibrioni sono per lo più assai scarsi, non si hanno buoni risultati seminando le feci direttamente sull'agar Dieudonné, perciò bisogna prima allestire le colture col metodo Schottelius (v. p. 1598), e da esse farne il trapianto.

Sull'agar Dieudonné possono crescere anche dei colerasimili, dei cocchi e dei coccobatteri (Gosio), ma i primi si differenziano appunto con l'agglutinazione, e gli altri non intralciano gran fatto la ricerca: in ogni modo si tratta di casi d'eccezione.

Metodo Di Vestea, modificato da Collodi. — Si adopera un vetrino escavato, ma con la celletta ellittica, molto allungata, ed un adeguato coproggetti rettangolare. Su questo si pongono in fila parecchie gocce di acqua peptonata 1-0.25 %, e si fanno comunicare le gocce fra loro per mezzo di sottili ponti di liquido. Nella prima goccia si semina il materiale sospetto; poi si fa aderire il portoggetti escavato al vetrino (v. p. 1228), e il tutto si pone in termostato. I vibrioni moltiplicandosi passano dalla prima alla seconda goccia, poi da questa alla terza, e così via, trovandosi in condizioni sempre più favorevoli, perchè nelle ultime gocce è ridotta al minimo la concorrenza vitale degli altri germi. Dopo 5-6 ore si osservano le gocce al microscopio: l'ultima conterrà, nei casi favorevoli, una coltura pura di vibrioni. Si interrompe allora il ponticello che la unisce alle altre gocce, assorbendolo con carta bibula, colla quale si possono anche asportare le altre gocce. Alla goccia rimasta si aggiunge il siero anticolerico in diluzione opportuna, eseguendo così la prova microscopica dell'agglutinazione.

Come per il metodo Dieudonné, anche per questo si richiede che le feci contengano molti vibrioni; se no, si ricorre prima alla coltura secondo Schottelius.

Metodo Ottolenghi. — S'infettano tre tubi di bile (preparata come è detto a p. 1257), l'uno con un'ansa, l'altro con tre, l'altro con cmc. 0.1 di materiale.

La bile è, secondo l'autore, un liquido di arricchimento. In alcuni casi dopo 4-9 ore di permanenza a 37°, in altri casi però solo dopo 20 o più ore, si ottiene un abbondante sviluppo di vibrioni; si fanno allora, oltre i preparati microscopici, i trapianti in agar, e le colonie che nascono su questo si possono adoperare per l'agglutinazione in goccia pendente.

Metodo Bandi. — Il Bandi, avendo osservato che un siero anticolerico agglutinante esercita uno stimolo specifico sulla moltiplicazione del V. del colera, ha proposto un metodo che permette di dimostrare in brevissimo tempo questo germe nelle feci, riuscendo così di grande utilità nella pratica.

La prova si eseguisce così. In tante provette con fondo conico e contenenti ciascuna 5 cmc. di acqua peptonata, si pongono quantità determinate di varie diluzioni di siero agglutinante, in modo che nelle diverse provette questo venga a trovarsi diluito in rapporti superiori a quelli che potrebbero dare fenomeni di gruppo: per esempio di 1:1000, 1:2000, 1:4000. . . . , e finalmente nel rapporto limite. Si semina in ciascuna provetta una grossa ansata di feci, e le provette si pongono a 37°, e si osservano ogni due ore.

Nel caso che le feci contengano i vibrioni del colera, questi si moltiplicano rapidissimamente, restando però agglutinati: l'agglutinazione si vede a occhio nudo, e può essere naturalmente verificata con preparati colorati. Spesso dopo 4-6 ore si ha il fenomeno evidente, talora anche dopo sole 2 ore.

Questo metodo è agevole e rapido, ed è senza dubbio vantaggioso in pratica, specialmente quando in un dato luogo si sono verificati casi certi di colera ed il numero dei casi in atto è già tanto grande da richiedere diagnosi pronte ed insieme sicure. Naturalmente i vibrioni agglutinati possono, se occorre, essere isolati in coltura pura, il che si richiede sempre nell'accertamento dei primi casi.

Lo stesso Bandi inoltre ha visto che si può eseguire il fenomeno di Pfeiffer nelle stesse provette in cui si sono moltiplicati ed agglutinati i vibrioni: a tale scopo si aggiunge il complemento, cioè siero fresco di coniglio, tanto che venga a trovarsi in ogni provetta diluito nel rapporto di 1:10; le provette si tengono a 37° per un'ora, indi si preleva una goccia di liquido dal fondo di esse e se ne allestiscono gocce pendenti per vedere se la disgregazione granulare è avvenuta o pur no.

Il metodo Bandi non esclude, s'intende, i metodi classici intesi a identificare il germe solo dopo che si è ottenuto l'isolamento di esso in col-

tura pura: si raccomanda anzi di fare uso, tutte le volte che si può, di più metodi insieme, opportunamente scelti, potendo ora l'uno ora l'altro di essi talora fallire per varie ragioni.

Tanto per dare un esempio, si possono eseguire insieme il metodo classico dell'acqua peptonata, quello di Dieudonné e quello di Bandi.

Vibrio metschnikowi]
o *Vibrione di Metschnikow.*

Fu trovato da Gamaleia nel 1888, come causa di una epizoozia di volatili, nella Russia meridionale: fu poi in altre simili occasioni ritrovato da Pfeiffer e da Kutscher. Produce una vera setticemia vibrionica.

Ha caratteri morfologici e colturali simili al V. del colera.

È patogeno in alto grado per il pollo e per il piccione. Inoculato nei muscoli pettorali di questi animali, anche in minima quantità, vi produce lesioni simili a quelle che dà B. del colera dei polli: solo la milza non è alterata.

Si distingue dal V. del colera sopra tutto per le reazioni immunitarie.

Vibrio proteus
o *Vibrione di Finkler e Prior.*

Fu trovato da questi autori nel 1884. Si può isolare dalle deiezioni di alcune persone sane, o diarroiche o sospette di colera.

È in generale più grosso del V. del colera; fluidifica più rapidamente ed intensamente la gelatina; coltivato in questa per infissione, la fluidifica a sacco, senza dar mai la bolla di gas che dà il V. del colera; coagula il latte e poi lo fluidifica di nuovo. È patogeno per i piccoli animali d'esperimento e produce sintomi e lesioni simili a quelle che dà il V. del colera. Da questo si differenzia principalmente per le reazioni immunitarie.

TRICOBATTERI O BATTERI FILAMENTOSI.

Essendo già stati in buona parte trattati questi germi nella *Microscopia* (v. p. 938 e seg.), con particolare riguardo alla loro importanza nelle acque, e d'altra parte nessuna loro forma essendo patogena, ci restringeremo a dire soltanto pochissime cose.

I tricobatteri hanno forma filamentosa, e sono da alcuni considerati come organismi pluricellulari. In essi, tranne le forme del genere *Beggiatoa*, ammettesi una moltiplicazione per gonidi, i quali distinguonsi dalle endospore, perchè si formano per frammentazione, non hanno una membrana spessa e tenace, non sono gran che resistenti agli agenti fisici e chimici, e sono capaci di trasformarsi, appena divenuti liberi, in corpi vegetativi, senza rottura della membrana. Gasperini interpreta queste formazioni come nient'altro che prodotti di frammentazione dei filamenti.

Abbiamo visto a p. 1354, quali sono i generi principali che sogliono ascriversi ai tricobatteri: definiamone ora le proprietà.

Beggiatoa: filamenti non ramificati, senza guaina, liberi, con movimento oscillatorio o strisciante torpido, con granuli di solfo.

Chlamydothrix: filamenti non ramificati, immobili, rigidi, circondati da una guaina di aspetto gelatinoso.

Thiothrix: filamenti semplici, immobili, non ramificati, rigidi, circondati da guaina e fissati per un capo ad un punto di sostegno: contengono granuli o goccioline di solfo.

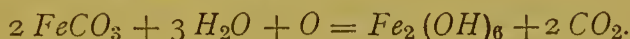
Crenothrix: filamenti come quelli del genere precedente: non contengono solfo, ma fissano il ferro sotto forma di un composto organoide.

Chladothrix: filamenti come i precedenti, ma con false ramificazioni.

Gasperini crede però non esservi abbastanza fondamento di osservazioni per considerare accettabile tale classificazione, a cui ha proposto di sostituire un'altra, che pur essendo provvisoria è più semplice: secondo questo autore tutti i batteri filamentosi vanno compresi nella famiglia delle *Beggiatoaceae*, coi tre generi *Beggiatoa*, *Crenothrix*, *Chladothrix*.

Questa classificazione è essenzialmente morfologica, ed elimina il criterio fisiologico dell'azione sui composti del ferro e del solfo. Infatti di tali trasformazioni biochimiche sono capaci diverse specie di *Beggiatoa*, come di *Chladothrix* e di *Crenothrix*. Al più si può fare, se si vuole, una distinzione puramente fisiologica, senza pretesa di classificazioni, tra forme ferrigene e forme tiogene.

Due forme ferrigene per eccellenza e molto diffuse da noi sono, secondo Gasperini, la *Beggiatoa kühniana* nelle sue varietà *maior*, *media* e *minor*, la *Beggiatoa ehrenbergi* e la *Crenothrix polyspora*; meno attiva è la *Cladothrix ramosa* Gasperini, meno ancora la *Chladothrix dichotoma* Cohn. Secondo Kaiser ed altri, la trasformazione che questi esseri compiono sul ferro risponde alla equazione



$$2\,FeCO_3 + 3\,H_2O + O = Fe_2(OH)_6 + 2\,CO_2.$$

Ma giustamente Gasperini osserva che il fenomeno di trasformazione non è così semplice: l'idrato ferrico non rimane tale e quale, ma, condensandosi principalmente nelle guaine, si trasforma in idrato ferrico organoide e dà i caratteristici tubicini entro i quali gl'individui di alcune specie restano rigidamente chiusi.

Tra le forme tiogene sono la *Beggiatoa alba* e la così detta *Thiothrix nivea* di Winogradsky; questa seconda forma, secondo Corsini, non merita di essere tenuta distinta, come genere, dal genere *Beggiatoa*. Corsini ha recentemente dimostrato che le granulazioni contenute nel corpo delle Beggiatoe tiogene sono di solfo puro; che anzi, più che granulazioni, sono goccioline oleose di solfo.

Le goccioline di solfo risultano dalla ossidazione biochimica dell'idrogeno solforato, secondo l'equazione



$$H_2S + O = H_2O + S.$$

ATTINOMICETI.

Questi germi hanno evidente rapporto con gl'ifomiceti, potendo considerarsi per alcuni rispetti come i più semplici loro rappresentanti (Gasperini), con morfologia molto semplice e senza complessi organi di riproduzione; d'altra parte dimostrano parecchie indisconoscibili affinità coi batteri. Astenendoci da ogni interpretazione circa la natura di tali rapporti, cioè se gli attinomiceti siano forme di evoluzione dei batteri verso gl'ifomiceti o forme regressive di questi, ci restringiamo semplicemente a considerarli come microrganismi che hanno caratteri intermedi fra gli schizomiceti e gl'ifomiceti.

Abbiamo visto che il B. della difterite, quello della morva, quello della tubercolosi ed altri simili possono in alcune speciali condizioni di accrescimento dare brevi ramificazioni e piccole clave; e siccome questi sono due caratteri eminentemente sviluppati negli attinomiceti, possono essere tenuti come principali argomenti morfologici di affinità.

Agli attinomiceti appartengono alcune forme patogene per l'uomo, ed assai più per gli animali, oltre a molte forme non patogene che vivono nell'ambiente.

Unico genere appartenente a questo gruppo è di solito considerato l'*Actinomyces*, ma vedremo come gli studi finora fatti inducano a stabilire altri generi. Sinonimo usitatissimo di *Actinomyces* è *Streptothrix*: ritenendo giusta l'osservazione di Gasperini, che cioè il secondo nome esistendo già nella terminologia scientifica per significare un genere di alghe, dovrebbe, per rispettare le convenzioni dei naturalisti, non essere usato per i microrganismi di cui ci occupiamo, diamo la scelta al primo nome.

Similmente indichiamo tutto il gruppo col nome di Attinomiceti invece di Streptotrichee.

Altri sinonimi di *Actinomyces* sono, almeno in parte, *Oospora*, *Nocardia*, *Micromyces*, *Cladothrix*.

Proprietà fondamentali.

Gli attinomiceti hanno un corpo vegetativo costituito da sottili filamenti più o meno lunghi, con ramificazioni laterali: in alcune forme i filamenti sono brevissimi e le ramificazioni appena abbozzate, in altre sono lunghissimi essi stessi e le loro ramificazioni. Si chiamano *ife* i filamenti; *micelio* il loro insieme, cioè tutto il corpo vegetativo. Alcuni attinomiceti possono, o nell'organismo infetto o nelle colture, dare filamenti e ramificazioni terminanti a clava. Sono tutti immobili, si colorano bene coi colori basici d'anilina e resistono quasi tutti al Gram: alcuni sono anche in parte acidoresistenti. Vi sono degli attinomiceti che producono corpicciuoli rotondi, i quali s'interpretano come spore, ma non

devono confondersi con le endospore dei bacilli; essi infatti si colorano come i filamenti vegetativi, non sono molto resistenti all'azione del calore, e si producono per frammentazione.

Si coltivano generalmente in tutti gli ordinari sostrati nutritivi; di solito non intorbidano mai i sostrati liquidi, e nei terreni solidi un buon numero di specie dà per lo più colonie compatte, difficilmente disgregabili, che vi aderiscono intimamente, approfondando in essi delle propaggini o fittoni: per questo, allorchè si deve prelevare un frammento di coltura, occorre fare uso di robusti uncini di platino.

Molti attinomiceti sono diffusi nell'ambiente: se ne trovano nell'aria, nell'acqua, nel suolo. Gasperini ha recentemente osservato che alcuni di essi nel terreno, dove si possono trovare fino alla profondità di un metro e mezzo, sono fra i più importanti fattori biologici dell'umificazione. Frequenti sono gli attinomiceti sui prodotti vegetali della terra, in particolar modo sulle graminacee.

Prima di passare alla descrizione delle principali forme appartenenti agli attinomiceti, diciamo come si possono dividere. Già abbiamo detto che Lehmann e Neumann hanno istituito i generi *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (v. p. 1478), cui appartengono rispettivamente il B. della tubercolosi ed il B. della difterite, da noi posti, per comodità, fra le Batteriacee: ora aggiungiamo che agli stessi generi appartengono parecchie altre forme, che furono considerate e denominate *Streptothrix* dagli autori che le isolarono e descrissero. Oltre a questi tre generi, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, ne accettiamo un quarto, proposto da Haass: *Actinobacterium*.

I criteri che servono per la distinzione dei quattro generi sono riassunti in questo specchietto.

Caratteri principali	*Actinomyces*	*Actinobacterium*	*Mycobacterium*	*Corynebacterium*
Dimensioni delle ife. . .	lunghe	brevi	brevi e disgregate in granuli	semplici bastoncini.
Ramificazioni	lunghe	brevi	rare e brevissime	rarissime e brevissime, in condizioni speciali.
Clave nell'organismo . .	+	+	appena accennate, incostanti	—
» nelle colture . . .	—	+	id.	+
Resistenza al Gram . . .	+	+	+	+
Acidoresistenza	parziale	—	+	—
Condizioni relative all'ossigeno	aerobio	anaerobio	aerobio	aerobio.
Condizioni relative alla temperatura	cresce bene anche sotto ai 25°	non cresce sotto ai 25°	cresce bene a temperature vicine a 37°	cresce bene a temperature vicine a 37°.
Aderenza ai terreni di coltura	+, per mezzo di fittoni	—	+, per superficie piane	—
Produzione di pigmenti.	+	—	+	—
Enzimi proteolitici . . .	+	—	—	—
Produzione di spore. . .	+	—	—	—
Azione patogena negli animali d'esperimento	—	noduli attinomicotici	tubercoli, pseudotubercoli	pseudomembrane, intossicazioni.

Actinomyces bovis.

Questo germe si trova nell'attinomicosi bovina, altrimenti nota col nome di sarcoma mascellare, benchè l'affezione non sia limitata alle mascelle, ma possa prendere anche la lingua e le tonsille ed i più svariati organi e tessuti. La natura infettiva di quest'affezione fu riconosciuta nel 1875 da Rivolta e Perroncito, i quali avevano del resto già parecchi anni avanti visti, ma non interpretati, gli elementi parassitari. La scoperta del germe è dovuta a Bollinger e Harz, nel 1876.

Caratteri microscopici.

Nei tessuti malati il parassita si presenta in aggruppamenti assai caratteristici. Si notano delle formazioni rotondeggianti, costituite da un intreccio centrale di ife più o meno disgregate, talora tanto da rendere l'impressione di un accumulo di forme cocciche e bacillari, circondato da una corona raggiata di elementi piriformi o clavati. Tale formazione dicesi rosetta (v. fig. 539); colorandola col metodo di Gram, si vedono nell'interno dei rigonfiamenti clavati le terminazioni delle ife colorate in violetto. Parecchie rosette si riuniscono insieme a formare granulini piccoli grigi e granulini più grossi di color solfo, i quali si trovano poi liberi nel così detto pus attinomicotico, risultante dalla fusione dei tessuti malati.

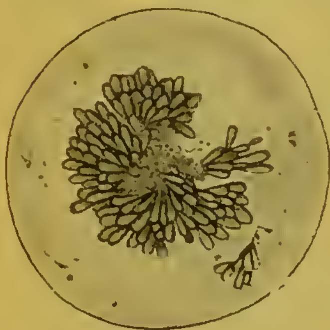


Fig. 539. — Rosetta attinomicotica.

Nelle colture questo germe dà filamenti lunghissimi, con lunghissime ramificazioni (v. fig. 540), talora fittamente intrecciate fra loro: talora le ife sono tutte o in alcuni tratti disgregate in granulini rotondi e bastoncini. I granulini rotondi non devono però confondersi con le spore, che sono sempre terminali ed appartengono soltanto alle ife aeree.



Fig. 540. — Micelio di *Actinomyces bovis* da coltura.

Colture.

L'*Actinomyces bovis* cresce fra 20° e 45°, con l'ottimo a 37°; è aerobio, ma può anche acconciarsi a un certo grado di anaerobiosi. Cresce su

tutti i terreni di coltura e prende intima aderenza coi terreni solidi per mezzo di fittoni.

Colonie su agar. — Colonie visibili dopo due giorni, rotondeggianti, rilevate, bianche o biancogiallastre, secche, rugose. A piccolo ingrandimento si mostrano formate di un centro compatto e di una corona di filamenti tortuosi, ramificati e intrecciati (v. fig. 541).

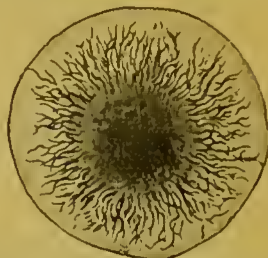


Fig. 541. — Colonia di *Actinomyces bovis* in agar.

Colonie in gelatina. — Crescono più lentamente che sull'agar, ma hanno del resto lo stesso aspetto. A piccolo ingrandimento presentano rilievi concentrici a contorno irregolare.

Coltura in brodo. — Dopo alcuni giorni sono manifeste piccole colonie sferiche, opache nel centro, quasi nebulose nella periferia, di colore biancastro, che si raccolgono in fondo lasciando il brodo limpidissimo (v. fig. 542).

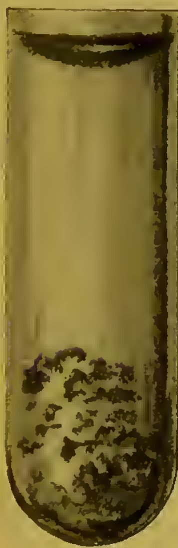


Fig. 542. — Coltura di *Actinomyces bovis* in brodo.

Strisciamento su agar. — In principio si hanno colonie isolate simili a quelle di sopra descritte: esse possono col tempo confluire e dare una patina irregolare, scabra, a guisa di una catena di colline, con numerose propaggini approfondate nel terreno nutritivo.

Infissione in gelatina. — Lo sviluppo è lentissimo: in superficie si ha una colonia rugosa, crostosa, come quella già descritta, e lungo la linea d'infissione si vedono coloniette giallognole talora munite di brevi propaggini (v. fig. 543). La gelatina viene lentamente fluidificata.



Fig. 543. — Infissione di *Actinomyces bovis* in gelatina.

Strisciamento su patata. — Si sviluppa come quello su agar e si pigmenta di color giallo solfo; dopo un certo periodo si ricopre di una efflorescenza biancastra finissima, costituita dalle ife aeree e dalle spore. La patata stessa imbrunisce intorno alla coltura e l'imbrunimento è assai più denso tutto intorno alla patina, la quale appare cerchiata di nero.

Coltura in latte. — Il germe cresce nel latte, coagulandolo prima e poi ridisciogliendo il coagulo.

Vitalità. — Essendo un germe che produce spore, ha una vitalità lunghissima nei terreni di coltura. Colture vecchie di anni, assolutamente inaridite, possono contenere ancora elementi vitali.

Attività biochimiche.

Questo germe non produce idrogeno solforato; produce indolo e e triptofane; scioglie il siero di sangue solidificato; attacca l'amido e la

destrina; scinde l'amigdalina; attacca debolmente il glicosio, il lattosio, il galattosio, il maltosio, con produzione di soli acidi; inverte il saccarosio, lascia intatta la mannite e l'inulina (Sampietro). Le colture tramandano odore di muffa.

Azione patogena.

I dati sull'azione patogena di questo germe sono controversi: possiamo certamente dire che è assai difficile dimostrarla negli animali d'esperimento.

Però dopo che Gasperini ebbe riconosciuto che l'*Act. bovis* nelle sue varietà corrisponde perfettamente alle così dette streptotrichee dell'ambiente e che con l'*Act. albus* isolato dal bue potè riprodurre nel cane lesioni svariate, essenzialmente granulomatose, non si può disconoscere che in circostanze favorevoli è dimostrabile sperimentalmente la sua azione patogena. Tanto per ricordare qualche altro esempio d'infezione sperimentale, diremo che Sanfelice inoculando un *Act. albus* nella cavia riprodusse una tipica actinomicosi, che altrettanto ottennero Lombardo-Pellegrino, Caminiti, Bellisari, Purpura, Isaia ed altri.

Isolamento e identificazione.

L'isolamento di questo germe è difficile: basta ricordare che Boström fece ben 700 colture in 11 casi per averne solo 12 positive.

La difficoltà è in parte dovuta alla coesistenza di altri germi nel pus attinomicotico.

Tuttavia si può profittare della straordinaria resistenza del germe, ed aspettare che nelle colture d'isolamento eventualmente inquinate gli altri germi periscano, per potere poi con sicurezza fare i trapianti dell'*Act. bovis*

L'identificazione riesce facile tenendo conto dei caratteri morfologici e colturali descritti e della sua rara azione patogena.

Altre forme appartenenti al genere Actinomyces.

1. *Actinomyces madurae* (sin. *Streptothrix madurae*): è considerato causa del pie' di Madura, e precisamente della varietà bianca, secondo le ricerche di Vincent.

2. *Actinomyces albus* (sin. *Streptothrix alba*), che non è acidoresistente, e comprende qualche varietà patogena, che inoculata nella cavia riproduce attinomicomi tipici (Sanfelice).

3. *Actinomyces chromogenes*, che fu isolato da Gasperini in casi di attinomicosi bovina. In generale non è acidoresistente: sulla patata dà colture pigmentate, ora d'un colore, ora d'un altro, per lo più giallo. È con esso identica la *Streptothrix nigra* di Rossi-Doria. Vi somigiia

l'*Actinomyces citreocremeus*, che Pasquini isolò da alcuni casi di attinomicosi mascellare nei piccioni.

4. *Actinomyces violaceus*, che è acidoresistente, e può avere azione patogena come l'*Actinomyces albus*. Fu isolato dall'aria e descritto la prima volta da Rossi-Doria col nome di *Streptothrix violacea*.

Actinobacterium israëli
o *Actinomyces hominis*.

Fu isolato da Wolff e Israël nel 1900 in due casi di attinomicosi umana, e poi ritrovato da vari autori in casi di attinomicosi umana e bovina.

Caratteri microscopici.

Presenta morfologicamente molte somiglianze col *B. diphtheriae*. Bastoncini snelli, con rare forme filamentose, talora con brevi ramificazioni, il più spesso con espansioni clavate ad una delle estremità; facilmente si osservano elementi in frammentazione granulare.

È immobile, asporogeno, resistente al Gram.

Non produce ife aeree.

Colture.

L'*Act. israëli* cresce preferibilmente in condizioni di anaerobiosi nei comuni sostrati nutritivi: l'ottimo di temperatura è 37°, il minimo 25° C.

Presenta caratteri colturali simili a quelli degli schizomiceti.

Colonie in agar. — Non presentano aderenza col terreno. Sono piccole, rugiadose, trasparenti, visibili solo verso il 3°-4° giorno di sviluppo, di colore biancastro o bianco-giallastro. A piccolo ingrandimento si presentano finamente granulose, talora di aspetto cespuglioso.

Colture in brodo. — Sedimento scarso, nubecolare; niente intorbidamento. Talora nella prima coltura di isolamento si vedono colonie bene individuate, di colore biancastro, perifericamente nubecolari.

Strisciamento su agar. — Sviluppo di colonie simili a quelle in piastra, non mai confluenti; l'acqua di condensazione rimane limpida.

Coltura in latte. — Nasce stentatamente nel latte, senza modificarne la reazione.

In gelatina e patata non cresce. Si moltiplica bene invece nelle uova intere, dando anche lunghi filamenti.

Attività biochimiche.

Non produce indolo, nè triptofane, nè idrogeno solforato.

Non produce acidi nè gas dai diversi zuccheri, come glicosio. lat-

tosio, maltosio, mannite, saccarosio, galattosio, inulina; non ha potere diastasico, nè inversivo, nè emulsivo, nè proteolitico.

Non produce pigmenti.

Azione patogena.

È patogeno per i comuni animali da esperimento (cavia, coniglio), nei quali riproduce un'attinomicosi generalizzata, con la formazione di tipiche rosette raggiate e clavate.

Isolamento ed identificazione.

L'*Act. israëli* si isola con grande facilità in agar o in brodo, quando si provvede alle opportune condizioni di temperatura e di anaerobiosi. Si identifica facilmente per i suoi speciali caratteri morfologici e colturali, e per l'azione patogena negli animali da esperimento.

Altre forme appartenenti al genere Actinobacterium.

1. Il microrganismo che Bruns isolò da un polmone attinomicotico: si distingue dall'*Actinobacterium israëli* perchè è aerobio.

2. Il microrganismo che Lignières e Spitz isolarono in casi di attinomicosi bovina, e che denominarono *Streptothrix spitzi*. A differenza dell'*Actinob. israëli* non riproduce mai nelle cavie attinomicomi, bensì focolai suppurativi.

Forme appartenenti al genere Mycobacterium.

1. Il microrganismo che Eppinger isolò da un ascesso cerebrale dell'uomo, e che denominò *Cladothrix asteroides:* altri sinonimi sono *Streptothrix eppingeri*, *Actinomyces asteroides*. È un germe che dà un bel pigmento arancione, ed è patogeno per il coniglio, in cui produce sempre una pseudotubercolosi, talora anche delle rosette con elementi periferici clavati (Mac Callum nel rene, Lubarsch nel cervello in seguito ad inoculazione sottodurale). È solo in parte acidoresistente, a differenza delle altre specie di *Mycobacterium*, che dimostrano un'acidoresistenza totale e perfetta.

Identificabili con questo germe sono la *Streptothrix japonica* isolata da Aoyama e Miyamoto in un caso di ascesso polmonare, la *Streptothrix* che Birt e Leishman isolarono da un empiema, l'*Actinomyces* isolato da Mac Callum in un caso di peritonite, l'*Actinomyces* che Schabad ottenne da uno sputo e dal pus di un ascesso, ed altri ancora.

2. Il microrganismo isolato da Nocard nel farcino bovino, e da lui chiamato *Cladothrix farcinica*: sinonimi sono *Streptothrix farcinica*, *Actinomyces farcinicus*. Inoculato nella cavia, non nel coniglio, produce una

pseudotubercolosi generalizzata. Feistmantel, inoculando le colture per via intravenosa, ottenne una tipica formazione di rosette, con elementi clavati, nel polmone. Anche questo germe ha un'acidoresistenza parziale.

3. Il germe che isolò Duncker da noduli attinomicotici nei muscoli del maiale, denominandolo *Actinomyces suis*, cui corrisponde l'*Actinomyces musculorum* di Hertwig.

4. Il germe che Silberschmidt coltivò dal polmone di una capra, col nome di *Streptothrix caprae*: è patogeno per la cavia ed il coniglio, nei quali riproduce una pseudotubercolosi.

Forme appartenenti al genere Corynebacterium.

1. Il germe che De Giaxa isolò da uno sputo col nome di *Streptothrix*, e che Di Donna riconobbe patogeno per la cavia, nella quale inoculato sotto cute produce la morte con fenomeni tossici.

2. Il microrganismo isolato da Schukewitsch in più casi di attinomicosi umana, e da lui denominato *Actinomyces*.

3. Il microrganismo che Silberschmidt isolò in casi di attinomicosi bovina, che cresceva preferibilmente in anaerobiosi e che fu dall'autore denominato *Actinomyces*.

4. I germi che Haass isolò dalle acque e dalle uova e che denominò per l'appunto *Corynebacteria*.

IFOMICETI.

Sotto questo nome si comprendono svariatissime forme di funghi inferiori, e fra esse alcuni agenti morbigeni: se ne dà qui un breve cenno, senza entrare in particolari che sconfinerebbero dalla portata di questo manuale.

Sono in generale caratterizzati da un corpo vegetativo filamentoso: i filamenti si chiamano *ife*, ed il loro insieme dicesi *micelio*.

Di molti ifomiceti si conosce bene la biologia, di altri invece le conoscenze sono imperfette, e principalmente fra questi trovasi la maggior parte delle forme patogene. Nelle forme ben conosciute si conoscono parecchie vie di riproduzione sessuale ed asessuale. Le muffe più comuni appartengono ai sottogruppi degli zigomiceti e degli ascomiceti.

Sono ben coltivabili in gelatina ed in agar, e prediligono una reazione neutra o una debole reazione acida.

Si adoperano perciò spesso il brodo e l'agar glicosati acidi. A tal uopo si tengono pronti questi due sostrati perfettamente neutri, ed una soluzione al 50 % di glicosio contenente il 10 % di acido tartarico sterilizzato. Al momento del bisogno si aggiungono V gocce di questa soluzione a 5 cmc. di brodo o di agar precedentemente fluidificato.

Zigomiceti. — Il genere più comune è il *Mucor.* Il micelio è composto di ife delicate, distinte in vegetative e fruttifere o fertili; fino al principio della fruttificazione non dimostra mai setti nelle ife, quindi rappresenta un'unica cellula. Ogni ifa fruttifera è terminalmente rigonfiata e sporge dentro un corpo rotondo, che è l'organo di fruttificazione e che vi aderisce. Quest'organo, che dicesi *sporangio*, ha forma sferica, contiene un gran numero di spore in mezzo ad una sostanza protoplasmatica diffusa, ed è limitato da una membrana che in principio è incolora, ma poi si fa bruna. Molte specie di *Mucor* dànno anche delle zigospore, risultanti dalla copula di due ramificazioni miceliche. Ma vi sono altre maniere di riproduzione, che qui si tacciono e che hanno luogo in condizioni speciali, come, per esempio, quando è scarso l'ossigeno, quando lo sviluppo avviene sott'acqua, ecc.

Non si conoscono specie patogene di *Mucor*; esse abbondano nelle sostanze organiche in putrefazione, sotto forma di espansi miceli bianchi o bruni.

Ascomiceti. — Ricordiamo fra questi i generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis.* Tutti e tre questi generi sono costituiti da un micelio pluricellulare.

Nell'*Aspergillus* le ife fruttifere terminano rigonfiate, ed il rigonfiamento è coperto da elementi cilindrici impiantati tutt'intorno, che portano ciascuno una catenella di spore: gli elementi cilindrici diconsi *sterigmi*, le spore chiamansi *conidi.*

Le ife fruttifere del genere *Penicillium* sono terminalmente ramificate, ed ogni ramificazione porta una catenella di conidi, onde risulta l'aspetto di un pennello.

Nel genere *Botrytis* i conidi sono riuniti a grappoletti intorno a brevi ramificazioni laterali delle ife.

Certe specie di *Penicillium* e di *Aspergillus* sono da alcuni ritenute causa indiretta della pellagra, per la tossicità delle spore da esse prodotte nel granturco guasto, specialmente in alcune stagioni dell'anno (Ceni); ma è questione assai contrastata.

Un'importanza speciale ha il *Penicillium brevicaule*, che è un sensibilissimo rivelatore dell'arsenico (Gosio), e la cui proprietà si può mettere in evidenza nel modo già detto a p. 1290.

Per dare un'idea della sensibilità rivelatrice di questo ifomiceta, ricorderemo che Gosio potè dimostrare una volta gr. 0.000,000,1 di arsenito sodico in mezzo chilogramma di pane.

I metodi per la ricerca dell'arsenico naturalmente possono variare secondo i casi. Generalmente si fa così: se trattasi di una sostanza solida sospetta di contenere arsenico, si tritura e si polverizza, poi si versa in un matraccio ben capace e vi si aggiunge altrettanto pane grigio assodato e sbriciolato; poi si versa dell'acqua in maniera da avere una

densa poltiglia. Se trattasi di un liquido, vi si aggiungono le briciole di pane in maniera da averne una pappa consistente.

D'altra parte si tritura e si stempera in acqua sterilizzata, od anche in brodo sterile, una coltura del fungo su patata, che sia ricca di spore. La sospensione così ottenuta si versa nel matraccio contenente la sostanza, in quantità non superiore a quella che la pappa può assorbire; indi si chiude col tappo di ovatta, e questo si copre con un cappuccio di gomma bene aderente. Il matraccio viene tenuto 24-72 ore a 37°, dopo di che si apre e si fiuta per ricercare l'odore eventuale di aglio, che è dovuto alla dietilarsina.

Fra le specie del genere *Botrytis* ricordiamo la *B. bassiana*, che è patogena per il baco da seta e che produce il così detto moscardino o calcino.

Anche allo stesso genere apparterrebbe, secondo Sabourand, il *Trichophyton tonsurans*, causa della tigna tricofitica, e dell'*Herpes tonsurans*, nelle sue molteplici varietà. Esso può coltivarsi su agar, su patata, su siero di sangue e su gelatina. Dà colonie bianche, fluidifica la gelatina, e specialmente nel siero di sangue dà un abbondante micelio e moltissimi conidi.

Ifomiceti d'incerta posizione sistematica. — Vi si comprendono le seguenti forme patogene:

Oidium albicans: è causa del mughetto, cioè di quella micosi della bocca, che da tempo antico è stata osservata nei poppanti. Si presenta sotto forma di un micelio formato da ife pluricellulari e da elementi rotondeggianti od ellissoidali, blastomicetoidi; ma, secondo la qualità delle sostanze nutritive, ora preponderano le ife, ora gli elementi ellissoidali.

Il fungo del mughetto cresce facilmente nei comuni terreni di coltura, è aerobio ed è favorito nel suo sviluppo da minime quantità di sostanze alcaline, dagli idrati di carbonio, dall'asparagina, dalla glicocolla, dalla leucina, dal tartrato di ammonio.

Achorion schönleinii: è causa della tigna favosa, ed è simile per alcuni rispetti ad un oidio. Ne sono state descritte parecchie varietà. Si coltiva nei comuni terreni di coltura, e le sue colonie tendono per lo più ad approfondarsi; caratteristiche sono le propaggini filamentose che si irradiano da esse. Le colonie sono in principio grigio-biancastre, più tardi giallastre. Il micelio è formato da ife senza setti, alcune delle quali sono terminalmente rigonfiate, e possono portare delle gemme laterali. Verso il quinto giorno di coltura, le ife si dividono in tanti pezzi ellissoidali, che possono per lungo tempo restare uniti.

Altri funghi imperfetti, ancor meno ben definiti, sono il *Microsporon furfur*, che è causa della *pityriasis versicolor*, e delle cui spore sono piene le squammette cutanee, ed il *Microsporon minutissimum*, che ha ife e spore piccolissime ed è causa dell'eritrasma.

Ricordiamo inoltre lo *Sporothrichum beurmanni*, che è causa della sporotricosi nell'uomo (Beurmann, Gougerot), nei ratti bianco e grigio (Lutz e Splendore), nel cane (Gougerot e Caraven). Questo germe si coltiva bene nel terreno di Sabourand, che è costituito di acqua peptonata 1 %, contenente il 4 % di glicosio ed agarizzata ad 1.8 %. Cresce in questo terreno speciale dando colonie o patine delicatamente pieghettate, brune o nerastre e alquanto aderenti, come quelle degli ifomiceti.

BLASTOMICETI (1).

MORFOLOGIA.

I blastomiceti patogeni neoformanti, di cui solamente si terrà conto in questo paragrafo, presentano identiche proprietà morfologiche.

Nelle colture.

Nei substrati di nutrizione artificiali i parassiti presentano una forma alquanto diversa da quella che mostrano nei tessuti degli animali morti in seguito alla inoculazione delle colture pure. Osservando i blastomiceti da una coltura fatta su uno dei comuni terreni di nutrizione, in goccia pendente di acqua, si vedranno come elementi in massima parte rotondi, piccoli e grandi, i primi con membrana propria appena distinguibile, i secondi con membrana abbastanza evidente e con contenuto protoplasmatico costituito da due sostanze, l'una rifrangente, l'altra ialina. La sostanza rifrangente o è addossata alla membrana in forma di cercine o semiluna, ovvero ha la forma di un grosso granulo centrale o di piccoli granuli per lo più riuniti nel centro. Queste particolarità di struttura si osserveranno, se i parassiti hanno vissuto un certo tempo sui substrati artificiali di nutrizione. Se i blastomiceti si osservano da colture recenti, allora appaiono uguali, presso a poco della grandezza dei corpuscoli rossi dell'uomo, con contenuto omogeneo e con membrana talmente sottile che si confonde con il contenuto protoplasmatico. A mano a mano che i parassiti invecchiano nelle colture vanno assumendo una forma più grande, avvicinandosi per grandezza alle cellule più grandi dell'organismo umano e mostrando una distinzione netta fra membrana e contenuto.

MOLTIPLICAZIONE.

Nelle colture, come nell'organismo animale, i blastomiceti si moltiplicano per gemmazione. Da un punto della periferia dell'elemento parassitario si forma una piccola estroflessione della membrana, che va sempre aumentando fino a raggiungere la grandezza dell'elemento che l'ha prodotta. Il distacco dell'elemento neoformato può avvenire per tempo, quando è an-

(1) Questo capitolo fu compilato dal prof. F. Sanfelice.

cora più piccolo dell'elemento generatore ovvero quando ha raggiunto la grandezza di questo.

I blastomiceti presi dalle colture si colorano facilmente con la maggior parte delle soluzioni idroalcooliche dei colori di anilina ed anche applicando il metodo di Gram. Non sono acido-resistenti.

Qualche volta alcuni dei granuli rifrangenti che fanno parte del contenuto protoplasmatico si mostrano acido-resistenti.

Modo di svilupparsi nei substrati di nutrizione.

I blastomiceti neoformanti si sviluppano rigogliosamente in quasi tutti i terreni di nutrizione comunemente usati in batteriologia.

Nel brodo nutritivo crescono intorbidandolo omogeneamente e dando qualche volta una spessa pellicola in superficie e lungo le pareti del tubo.

Sulle piastre di gelatina, tenute alla temperatura dell'ambiente (15-20° C.) dopo alcuni giorni si sviluppano colonie superficiali più grandi e colonie profonde più piccole.

Mentre le prime sono rotonde, della grandezza di una testa di spillo, bianche, sollevate a cupola sulla superficie del terreno di nutrizione, le seconde sono più piccole, a margini netti, di colorito tendente leggermente al giallo-chiaro.

Nelle colture piatte in agar la forma delle colonie è perfettamente identica a quella innanzi descritta.

La cultura per infissione in gelatina presenta sviluppo abbastanza rigoglioso in superficie e lungo lo innesto. In superficie ha luogo la formazione di una patina bianca, di aspetto umido, con bordi netti; lungo lo innesto si forma una striscia biancastra, fatta di tante colonie, strettamente unite le une alle altre.

I blastomiceti neoformanti non hanno la proprietà di fondere la gelatina.

Sulla superficie dell'agar solidificata obliquamente nei tubi si osserva da principio la formazione di una pellicola bianca, omogenea, con bordi netti, che man mano che la coltura va invecchiando, cambia aspetto. La parte centrale va ripiegandosi ed acquista un colore tendente leggermente al giallo, mentre la parte periferica conserva l'aspetto che aveva prima.

Molto caratteristica è la coltura su patata.

Nei primi giorni dopo lo innesto si forma una pellicola sottile, appena distinguibile, che nei giorni successivi va ispessendosi, sollevandosi sulla superficie del terreno di nutrizione ed acquistando un colorito bruno intenso. La patina ha aspetto secco, i suoi bordi sono netti, la sua superficie mammellonata.

Nei tessuti dell'organismo.

Come si è detto innanzi, la morfologia dei parassiti nei tessuti degli animali morti in seguito alla inoculazione delle colture pure è diversa da quella che essi presentano nelle colture.

Nello interno dei tessuti i blastomiceti patogeni o si presentano sotto la forma di corpi capsulati o sotto la forma di corpuscoli privi di capsula, denominati fucsinofili dal Russell, perchè hanno speciale affinità per la fucsina acida.

Corpi capsulati nel cancro.

Sotto la forma di corpi capsulati i blastomiceti furono osservati nei tumori maligni (cancro e sarcoma) e furono ritenuti come appartenenti ai protozoi.

Una delle prime descrizioni esatte di questi parassiti si deve al Darier, il quale nell'epitelioma pavimentoso lobulato del capezzolo, conosciuto sotto il nome di malattia del Paget trovò delle forme che aveva prima osservate nella psorospermosi follicolare vegetante, a proposito delle quali si esprime nel modo seguente: « I loro caratteri netti senza forma di transizione con le cellule normali, la loro membrana spessa e rifrangente, che non appartiene ad alcuna cellula dei vertebrati superiori, salvo che alle cellule del tessuto cartilagineo, la loro distribuzione nello strato malpighiano, ove si trovano ora isolate, ora a gruppi, la loro sede intracellulare, conducono a considerarle come estranee all'organismo e come appartenenti a parassiti ».

Le stesse forme capsulate furono in seguito descritte nel cancro dallo Albarran, dal Foà, dal Soudakewitch, dal Ruffer, dal Plimmer e da altri.

Corpuscoli fucsinofili del Russell.

Spetta senza dubbio al Russell il merito di avere accennato alla esistenza di blastomiceti nei tumori maligni dell'uomo. Egli descrisse sotto il nome di corpuscoli fucsinofili alcuni corpi completamente sferici, grandi da 4 a 12 micromillimetri, omogenei, senza traccia di struttura. Li riscontrò per lo più in gruppi di 3 a 20 e nello interno delle cellule cancerigne, circondati dal protoplasma cellulare o da un alone chiaro o al di fuori delle cellule cancerigne, nello stroma del tumore, nei vasi linfatici. L'autore ritenne questi corpuscoli per parassiti e li classificò fra i blastomiceti, attribuendo loro una parte importante nella genesi dei tumori maligni.

Descrizione delle forme capsulate.

Le forme capsulate che i blastomiceti presentano nei tessuti e che si possono ben vedere dissociando piccoli pezzi di glandole linfatiche di cavie e ratti morti in seguito alla inoculazione di colture pure, sono in parte allo stato libero, in parte comprese nei plasmi cellulari.

I parassiti allo stato libero sono limitati da una membrana a doppio contorno che a fresco appare rifrangente e nei preparati colorati appare intensamente colorata. Questa membrana è meno spessa negli elementi più piccoli, più spessa in quelli più grandi ed alle volte circondata da un alone

ialino molto vario per spessezza. Il contenuto per lo più è formato da un protoplasma omogeneo, nel quale alle volte vi sono granuli rifrangenti vari per numero, forma, grandezza (fig. 544).

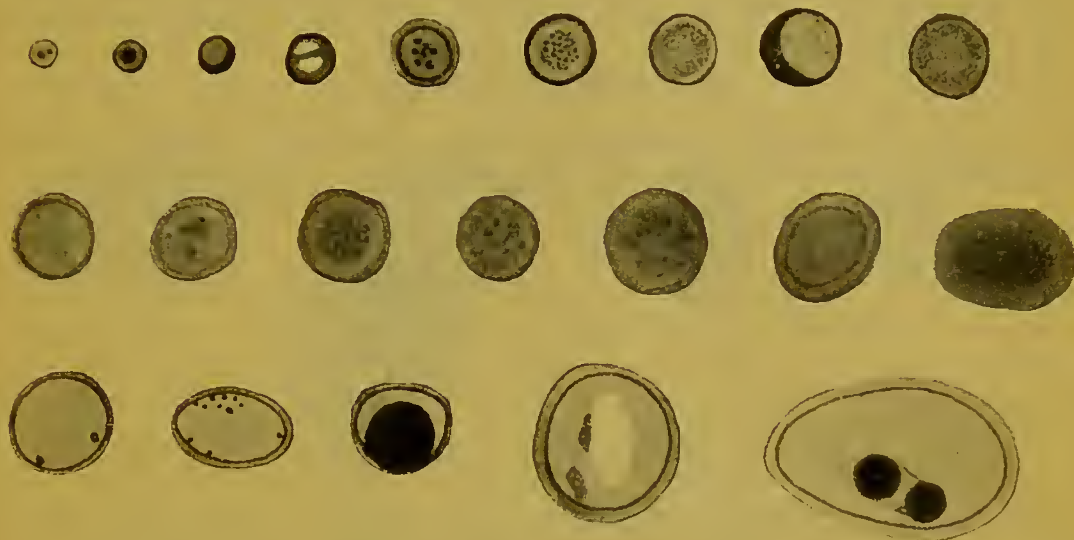


Fig. 544.

Forme capsulate a più aloni.

Forme speciali di blastomiceti capsulati ad aloni molteplici sono state da me osservate nei polli (fig. 545). Queste forme presentano a fresco una membrana rifrangente a doppio contorno, che nella figura 545 è rappresentata come

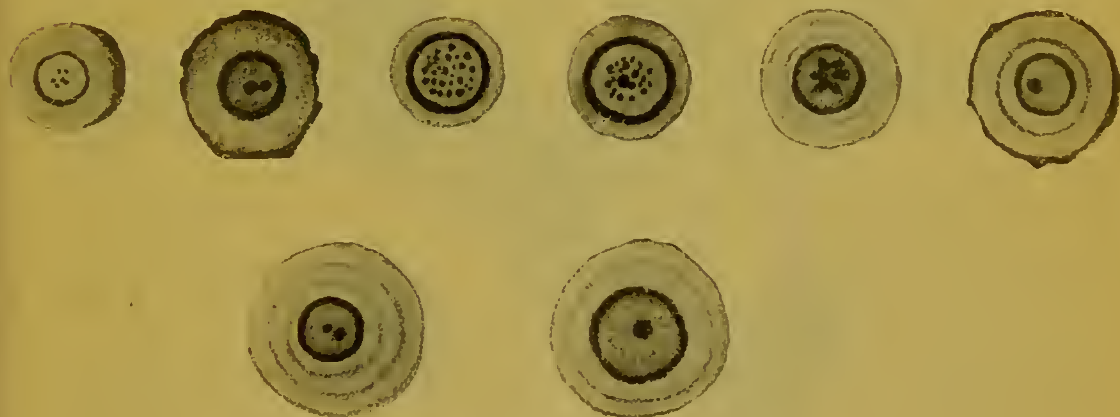


Fig. 545.

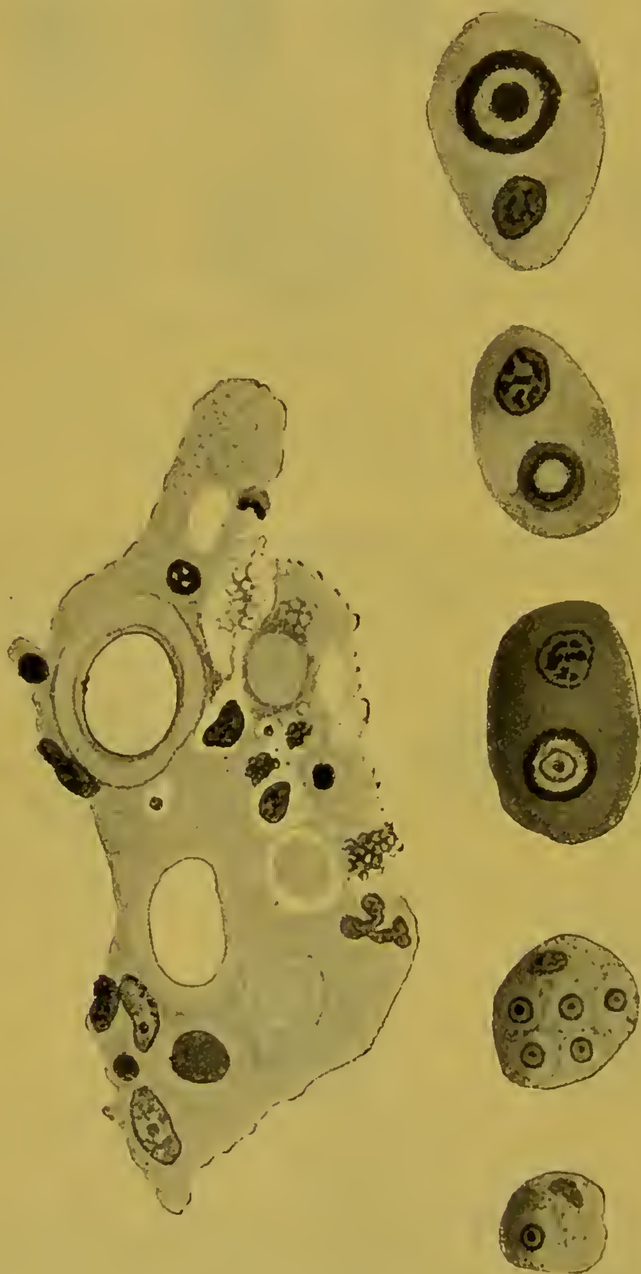
un cercine nero. Questa membrana limita il contenuto protoplasmatico, nel quale vi sono spesso uno, due o più granuli della stessa rifrangenza della membrana. Allo esterno della membrana rifrangente vi è un alone ialino molto diverso per spessezza nei diversi elementi e diverso anche per struttura da elemento ad elemento. In alcuni parassiti è omogeneo, perfetta-

mente ialino; in altri mostra dei cerchi concentrici, costituiti da un protoplasma diversamente rifrangente.

Alcune di queste forme blastomicetiche intorno all'alone ialino presentano un *detritus* proveniente dall'elemento cellulare, nel quale i parassiti erano annidati.

Forme capsulate endocellulari.

Le forme capsulate di blastomiceti contenute nei plasmi cellulari mostrano le stesse particolarità morfologiche già notate nelle forme libere (fig. 546).


Fig. 546.

Spesso intorno ad alcune di queste forme endocellulari vi è un alone ialino dato non dal blastomicete, ma dal plasma cellulare. Probabilmente si tratta della usura di una parte del plasma cellulare prodotta dal parassita.

Moltiplicazione nell'organismo.

La moltiplicazione dei blastomiceti nei tessuti dell'animale morto in seguito ad inoculazione di colture pure avviene per gemmazione, così, come ha luogo nei parassiti che si sviluppano sui substrati di nutrizione solidi (fig. 547).



Fig. 547.

Forme incrostate di sali calcarei.

Accanto alle forme parassitarie capsulate che finora sono state descritte, ve ne sono alle volte delle altre, che rifrangono fortemente la luce, alla stessa guisa del vetro e fanno la impressione come se fossero dovute ad incrostazione di sali calcarei. Spesso più parassiti sono uniti insieme, quasi cementati dalla sostanza calcarea (fig. 548).



Fig. 548.

La incrostazione di sali calcarei avviene tanto sulle forme isolate senza gemmazione, quanto su quelle in via di moltiplicazione con produzione di piccole gemme o ifi. S'incrostano di sali calcarei anche i parassiti che qua e là negli organi sono disposti a gruppi.

Interessante era studiare il modo di comportarsi dei blastomiceti incrostati di sali calcarei verso i reagenti chimici per conoscere la natura chimica della sostanza che depositandosi in essi, ne produceva la morte. Se le masse di blastomiceti degenerati si trattano con acido solforico, si sciolgono e subito dopo compaiono sul posto lasciato vuoto dalla massa calcarea dei

cristalli aghiformi disposti a raggi intorno ad un centro comune, simili del tutto a quelli del solfato di calcio. Trattate con acido nitrico e cloridrico, le masse calcaree scompaiono, senza dar luogo ad effervescenza; si sciolgono anche se sono trattate con acido acetico.

Escluso che le masse calcaree fossero costituite da carbonato di calcio, perchè non si erano sciolte con effervescenza negli acidi, bisognava vedere se si trattava di ossalato o fosfato di calcio. Sapendo che l'ossalato di calcio è solubile nelle soluzioni calde dei sali appartenenti al gruppo magnesiaco, ho applicato tale reazione alle masse calcaree ed ho veduto che non si sciolgono nei sali di magnesio a caldo e quindi non si tratta di ossalato di calcio, ma di fosfato.

Forme involutive nei tessuti.

Alcune forme di blastomiceti capsulati presentano una fusione della sostanza cromatica in masse più o meno irregolari, in modo da differenziarsi

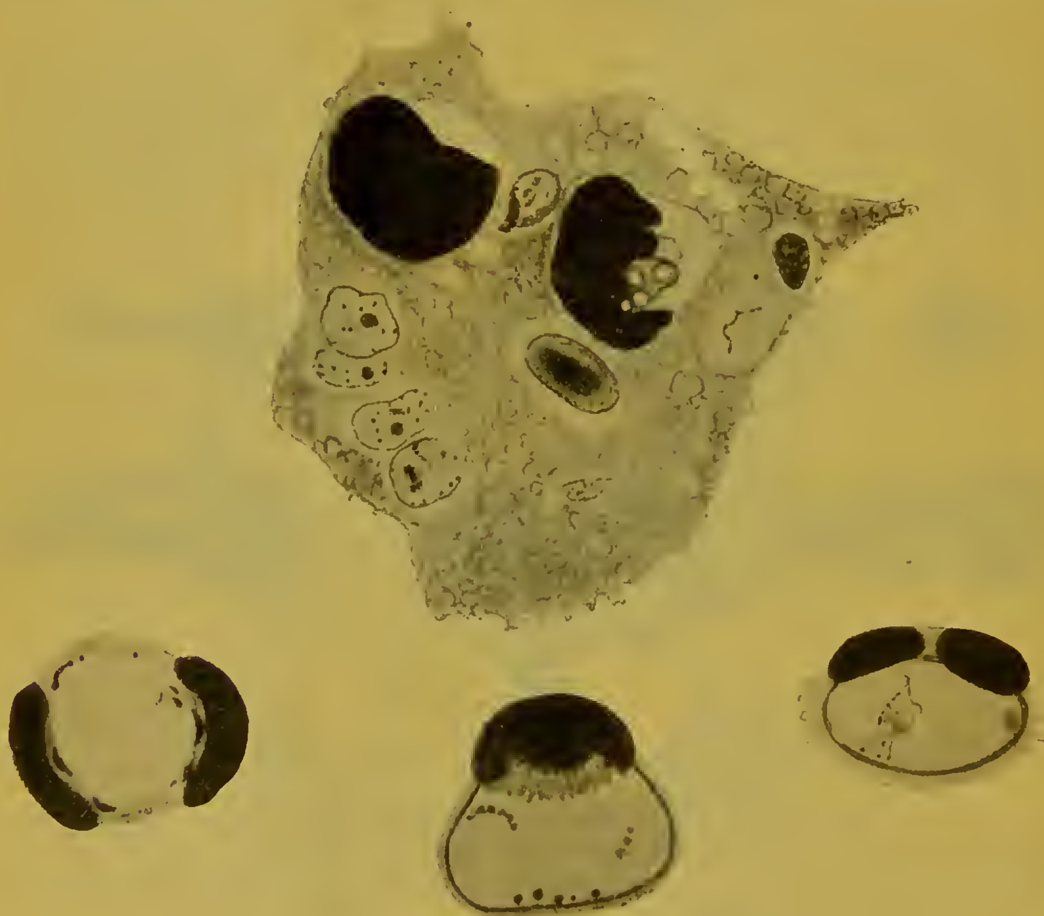
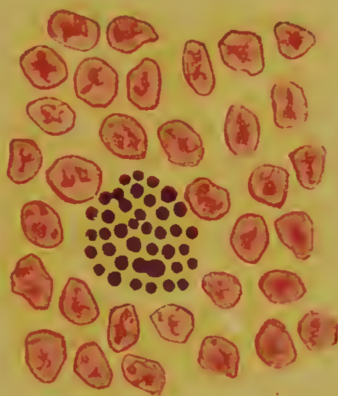
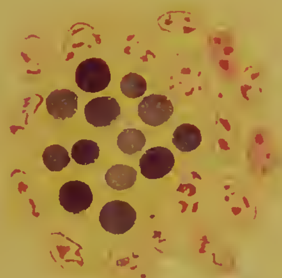


Fig. 549.

molto chiaramente dalle forme parassitarie normali, di cui innanzi si è fatta menzione. Si tratta di forme parassitarie degenerate, che non sono più capaci di svilupparsi nei substrati artificiali di nutrizione (fig. 549).

BLASTOMICETI.







Corpuscoli fucsinofili dovuti all'anticorpo saccaromicetolitico.

I corpuscoli fucsinofili descritti dal Russell si distinguono nettamente dalle forme parassitarie capsulate. La causa della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli fucsinofili risiede nelle proprietà speciali del siero di sangue degli animali inoculati (vedi Tav. VI).

Inoculando il siero di sangue dei cani, trattati con le proteine dei blastomiceti morti, nelle vene dei gatti contemporaneamente alle colture dei blastomiceti patogeni vivi, la morfologia dei parassiti nei tessuti si presenta diversa da quella che si osserva in seguito alla inoculazione endovenosa dei soli blastomiceti patogeni.

La immunizzazione dei cani riesce facilmente, inoculando loro nel connettivo sottocutaneo o nella cavità addominale, più volte nel corso di parecchi mesi, le proteine dei blastomiceti morti. Se ai cani, trattati nel modo detto innanzi, s'inoculano nelle vene i blastomiceti patogeni, non si osserva alcun che di anormale.

Mentre nei gatti inoculati in vena con i soli blastomiceti patogeni, questi in massima parte si presentano sotto la forma capsulata, nei gatti inoculati in vena con siero di sangue di cani immuni e con blastomiceti patogeni, sono ordinariamente scarsi i parassiti capsulati e sono invece numerosi i corpuscoli fucsinofili.

I corpuscoli fucsinofili sono specialmente abbondanti nel midollo delle ossa, nella milza e nelle glandole linfatiche.

Il fenomeno della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli di Russell è analogo a quello che si verifica per alcuni batteri e che porta il nome di batteriolisi ed è perciò che bisogna denominarlo « saccaromicetolisi » o « blastomicetolisi ».

Se nei gatti inoculati in addome e nei tumori maligni dell'uomo e degli animali si rinvengono blastomiceti sotto la forma di corpuscoli fucsinofili e non sotto la forma capsulata, ciò vuol dire che morti alcuni dei parassiti, con le loro proteine hanno provocato una reazione da parte delle cellule dell'organismo, con la formazione nel siero di sangue della sostanza o anticorpo saccaromicetolitico, che ha trasformato i restanti parassiti in corpuscoli a fucsina.

I corpuscoli fucsinofili non sono blastomiceti vivi e le forme di riproduzione che essi mostrano, sono false gemmazioni. Si spiegano a questo modo tutti i risultati negativi ottenuti praticando le colture dal midollo delle ossa, dalla milza e dalle glandole linfatiche dei gatti morti in seguito ad inoculazione contemporanea di siero di sangue di cani immunizzati e di coltura di blastomiceti patogeni.

L'obbiezione messa innanzi da alcuni osservatori, che i corpuscoli fucsinofili riscontrati nei tumori maligni non hanno alcuna importanza etiologica, perchè si possono riscontrare anche nei tessuti normali ed in processi patologici affatto diversi dai tumori maligni, non ha alcun valore. Sarebbe lo stesso che si volesse negare la importanza etiologica di alcuni microrganismi patogeni sol perchè si rinvengono nell'organismo sano. Si sa che nell'organismo sano esistono numerosi blastomiceti e ricerche fatte in proposito hanno dimostrato che se ne trovano sulla cute, sulla mucosa boccale

intestinale, vaginale, ecc. Ora per lesioni avvenute sulla cute e sulle mucose questi blastomiceti possono penetrare nei tessuti e dar luogo dopo la loro morte alla formazione della sostanza saccaromicetolitica, la quale trasformerebbe in corpuscoli a fucsina i blastomiceti ancora vivi. Nè deve far meraviglia che in tessuti patologici dell'uomo diversi dai tumori maligni si rinvengano i corpuscoli di Russell.

Finchè ricerche rigorose non abbiano dimostrato che con la inoculazione di colture pure di blastomiceti si possono produrre simili lesioni anatomo-patologiche, non siamo autorizzati a ritenere che quei corpuscoli a fucsina abbiano prodotto la lesione e possiamo pensare invece che essi sieno quelli accidentali della cute e delle mucose, che penetrati nei tessuti abbiano dato luogo alla formazione dell'anticorpo e si sieno trasformati in corpuscoli fucsinofili.

Azione patogena.

Gli animali che si dimostrano più suscettibili all'azione patogena dei blastomiceti sono i ratti, i topi, i cani, le cavie, i gatti.

Quando i blastomiceti patogeni neoformanti si coltivano in speciali substrati di nutrizione, son capaci di produrre dei prodotti solubili, delle tossine, le quali hanno il potere di stimolare gli elementi cellulari che si trovano in condizione di recettività, alla riproduzione atipica ed alla formazione di tumori epiteliali e connettivali.

Bisogna quindi distinguere, quando si parla di azione patogena dei blastomiceti, se si tratta di reperti ottenuti inoculando i soli parassiti senza le tossine ovvero di reperti ottenuti inoculando solamente i prodotti solubili. Per studiare l'azione patogena esercitata dai soli parassiti basta prendere un po' della patina colturale dalla superficie della patata, farne emulsione in acqua sterile ed inocularne poche goccie negli animali. Per studiare l'azione esercitata nell'organismo animale dalle tossine, bisogna coltivare i blastomiceti patogeni neoformanti in liquidi speciali, chiudere i recipienti alla fiamma, aspettare che i parassiti muoiano e poi fare le inoculazioni del liquido di coltura.

Non è necessario separare dal liquido di coltura i corpi morti parassitari per la ragione che questi non producono nell'organismo che solamente la formazione dell'anticorpo saccaromicetolitico e non dànno alcuna reazione neoformativa da parte degli elementi cellulari dell'organismo.

I ratti bianchi sono animali che si prestano molto bene allo studio dell'azione patogena dei blastomiceti e delle loro tossine. Essi sono molto sensibili tanto agli uni, quanto alle altre, ma reagiscono in modo diverso.

Inoculazioni di soli parassiti nei ratti.

Inoculando nel connettivo sottocutaneo i soli parassiti si ha la morte degli animali dopo uno, due e più mesi, con la formazione di tumori più o meno grandi nel sito d'inoculazione e con lesioni considerevoli nelle glandole linfatiche, nel fegato, nei reni, nella milza e nel cervello. All'esame

microscopico si vede che queste neoformazioni sono costituite, più che dagli elementi cellulari dell'animale, da grandissimo numero di parassiti (fig. 550). Si tratta quindi di pseudotumori e non di vere neoproduzioni cellulari.

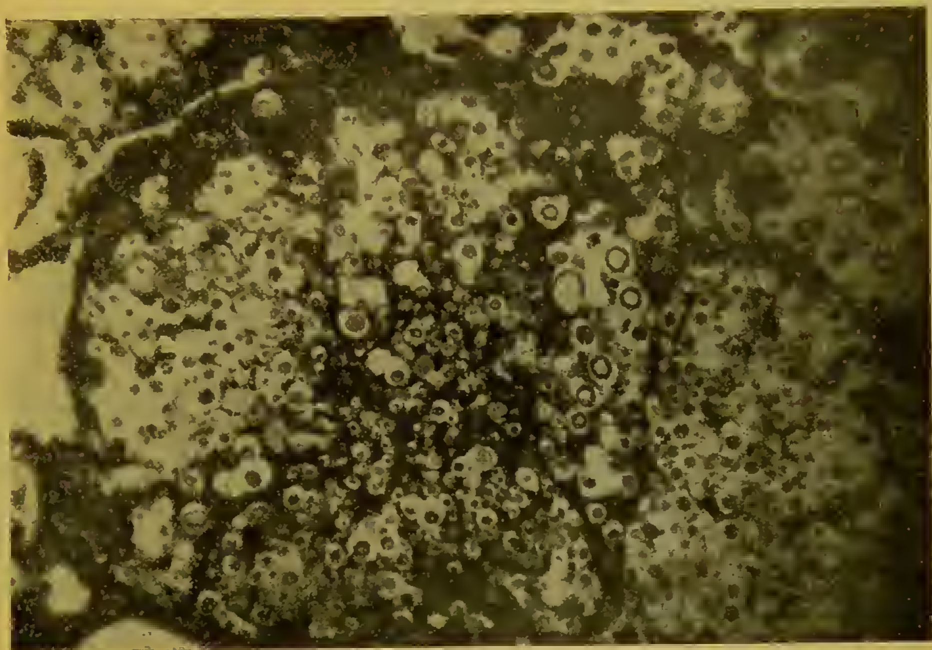


Fig. 550.

Queste blastomicosi, date dalla moltiplicazione dei blastomiceti patogeni nell'organismo, con scarsa reazione da parte degli elementi cellulari, non hanno nulla a che fare con le vere neoplasie. Quando insieme con la infezione ha luogo la intossicazione, quando cioè nell'organismo dell'uomo e degli animali la tossina elaborata dai parassiti trova elementi cellulari capaci di essere stimolati, allora con la moltiplicazione da parte delle cellule dell'organismo, che hanno fissata la tossina, le lesioni istologiche vanno perdendo il carattere dei processi infiammatori cronici e vanno sempre più avvicinandosi ai processi neoplastici maligni.

Inoculazione di parassiti e tossine nei ratti.

Inoculando nella cavità addominale dei ratti i parassiti insieme con le tossine si hanno ordinariamente masse neoplastiche principali nel grande omento e nel mesentere e masse neoplastiche secondarie nei reni, nel fegato, nei polmoni (fig. 551 e 552).



Fig. 551.

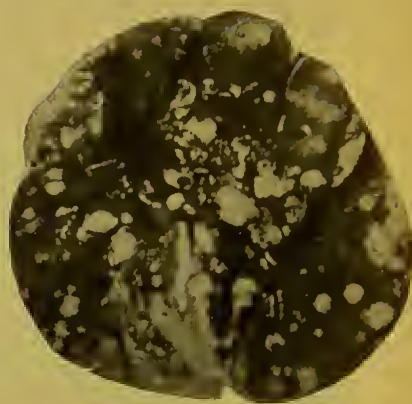


Fig. 552.

Inoculazioni di sole tossine nei ratti.

Inoculando nei ratti le sole tossine si osservano neoformazioni nella cavità addominale, nei polmoni, allo aspetto microscopico molto simili a quelle descritte nei ratti inoculati con parassiti e tossine. In alcuni ratti, se si fanno le inoculazioni nel connettivo sottocutaneo, si sviluppano delle neoformazioni simili del tutto agli epiteliomi di origine malpighiana che si osservano nell'uomo.

Struttura dei tumori prodotti nei ratti.

Gli elementi cellulari parenchimali che costituiscono le neoformazioni prodotte nei ratti con la inoculazione delle tossine, hanno nuclei vescicolari ricchi di sostanza cromatica e corpi cellulari ampî e sono disposti a gruppi, separati da scarsi elementi stromali. Verso la periferia delle neoformazioni il tessuto neoplastico tende ad infiltrare il tessuto sano sotto forma di cordoni neoplastici, in guisa da fare la impressione come se le cellule, penetrate in spazi lacunarî linfatici, li avessero riempiti completamente. In alcune sezioni si vedono le pareti dei piccoli bronchi e dei vasi sanguigni attraversate dalle cellule neoformate, le quali penetrate nel lume, tendono ad invaderlo quasi del tutto. Da ciò si spiega la presenza di emboli e di tronchi neoplastici in alcune vene. Con la usura delle pareti vasali si spiegano i versa-

menti ematici che qua e là presenta il tessuto neoformato. Questo tessuto neoplastico presenta identità di struttura con alcuni endoteliomi della pleura osservati nell'uomo (fig. 553).

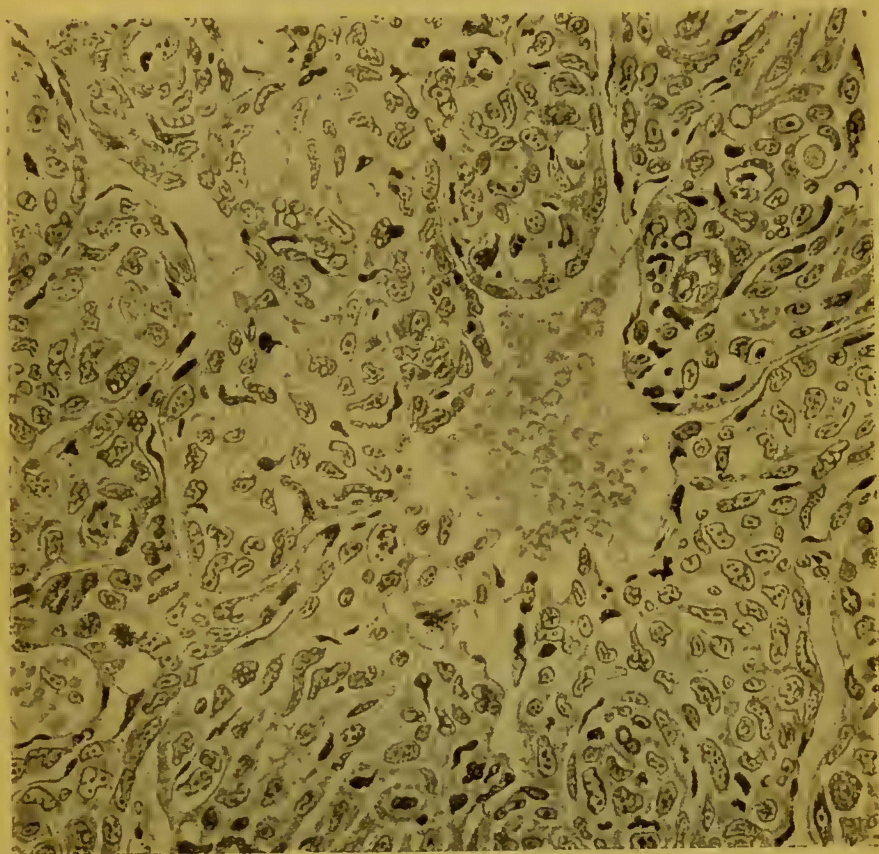


Fig. 553.

Quanto alla istogenesi delle neoformazioni osservate nei polmoni dei ratti, si può stabilire, uccidendo di 10 in 10 giorni gli animali inoculati in addome con le tossine, che le neoproduzioni si originano da cellule a tipo endoteliale che si moliplicano in vicinanza di piccoli vasi sanguigni. Se queste cellule endoteliali si sono moltiplicate in sito ovvero sono pervenute negli spazi linfatici perivasali dalla superficie peritoneale è difficile dire. I noduli incipienti sono costituiti da scarso numero di queste cellule con nucleo vescicolare ed ampio corpo protoplasmatico.

Azione patogena dei blastomiceti negli altri animali.

Nelle cavie con la inoculazione dei soli parassiti si produce una infezione tipica blastomicetica con formazione di pseudotumori, cioè a dire di masse neoformate costituite in massima parte da cumuli di parassiti. Nei conigli si può avere la infezione blastomicetica inoculando i soli parassiti, e la formazione di veri tumori inoculando le sole tossine.

Nei cani, inoculando i soli parassiti nelle vene o nella cavità addominale o in alcuni organi, si può osservare con risultato non molto frequente la produzione di veri tumori. Con la inoculazione di soli prodotti solubili si generano con maggiore frequenza veri blastomi.

Conclusioni sui risultati delle inoculazioni.

Da tutti gli esperimenti d'inoculazione si possono dedurre le seguenti conclusioni:

1° Le cellule dell'organismo reagiscono all'azione delle tossine dei blastomiceti patogeni moltiplicandosi con alterazione della forma e della funzione, e producendo un tessuto neoplastico, dal quale possono distaccarsi particelle che trasportate dalla corrente linfatica o sanguigna, vanno a fermarsi a distanza negli organi, generando ivi nuovo tessuto, per struttura simile a quelle onde esse provenivano.

2° Siccome il fatto, cui innanzi si è accennato, costituisce il carattere fondamentale che differenzia i tumori maligni dai tumori di infiammazione cronica, le lesioni prodotte dalle tossine dei blastomiceti devono essere classificate fra le vere neoplasie.

3° Le tossine dei blastomiceti patogeni prodotte in un sito qualunque dell'organismo, possono esercitare la loro azione a distanza, su cellule che si trovano in speciali condizioni di recettività.

La tossina agisce da antigeno.

Le tossine dei blastomiceti patogeni inoculate negli animali in dose considerevole e per lungo tempo hanno la proprietà di determinare nel sangue degli animali la formazione di anticorpi specifici. Come animali produttori di siero si scelgono i cani del peso di 14-15 chili. Le inoculazioni della tossina dapprima attenuata e poi integra si praticano nel connettico sottocutaneo. Il siero dei cani trattati con le colture contenenti parassiti morti e tossina ha potere battericida ed antitossico. Per saggiare questo potere bisogna usare i ratti del peso medio di 200 grammi, perchè questi sono gli animali più suscettibili tanto all'azione dei soli parassiti, quanto all'azione combinata dei parassiti e delle tossine. Se un ratto del peso di 200 grammi inoculato nella cavità addominale con un miscuglio di $^{1}/_{10}$ di cmc. di siero ed un cmc. di cultura, sopravvive alla inoculazione, vuol dire che il siero ha un alto valore curativo.

Col siero dei cani preparati si possono salvare anche i ratti, nei quali la infezione sola o la infezione e la intossicazione è in atto, purchè la cura non si cominci troppo tardi. La tossina una volta legata stabilmente alle cellule non si lascia più staccare dalla antitossina.

Sieroterapia dei tumori maligni.

Il siero dei cani trattati con le colture dei blastomiceti patogeni contenenti parassiti morti e tossine è capace di far regredire i tumori maligni, pur che sia adoperato in tempo.

La regressione del tessuto sarcomatoso e del tessuto cancerigno si è potuto seguire minutamente nei cani che presentavano cancri e sarcomi spontanei. Si è potuto constatare che la regressione del tessuto neoplastico era in stretto rapporto con il numero d'iniezioni praticate e con la quantità di siero inoculata. Si è potuto vedere inoltre che il siero agisce prima sulle metastasi e poi sul tumore primitivo.

Un tumore abbastauza frequente nei cani è il linfosarcoma prepuziale, che si sviluppa da speciali elementi linfoidi, i quali si trovano disposti a gruppi nel connettivo sottoepiteliale della mucosa prepuziale. Questi tumori che alle volte assumono considerevoli proporzioni dànno rapidamente metastasi nelle glandole linfatiche dell'addome, nel fegato, nel connettivo sottocutaneo, nelle glandole linfatiche inguinali ed ascellari.

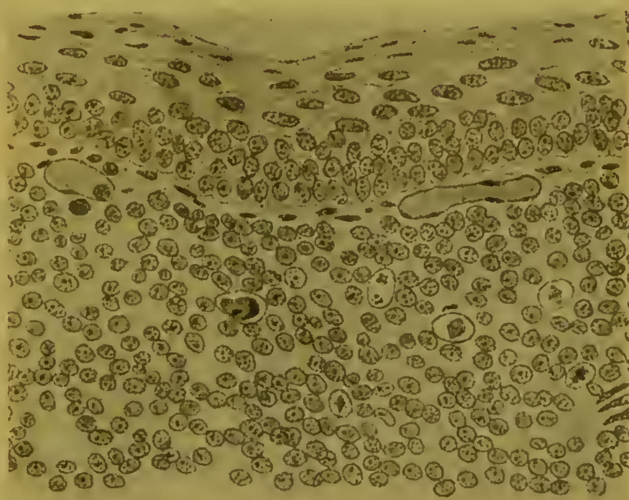


Fig. 554.

Il linfosarcoma prepuziale (fig. 554) presenta la parte parenchimale costituita da elementi cellulari rotondeggianti con nuclei grandi e ricchi di cromatina e corpi plasmatici poco estesi. Sono abbondanti le figure cariocinetiche. La parte stromale è poco abbondante e forma un sottile reticolo, nelle cui maglie sono contenuti gli elementi neoplastici. L'epitelio della mucosa che riveste il tumore non prende parte alla neoformazione ed è solamente disteso dalla moltiplicazione degli elementi neoplastici.

Qualche tempo dopo lo inizio della cura specifica, togliendo qualche pezzo dalla neoplasia, si può constatare l'azione benefica del siero. Gli elementi neoplastici sono scarsi, con corpi plasmatici irregolari, con nuclei de-

formati, in massima parte picnotici, con dissoluzione della sostanza cromatica (fig. 555).

Progredendo sempre più la degenerazione degli elementi neoplastici, si

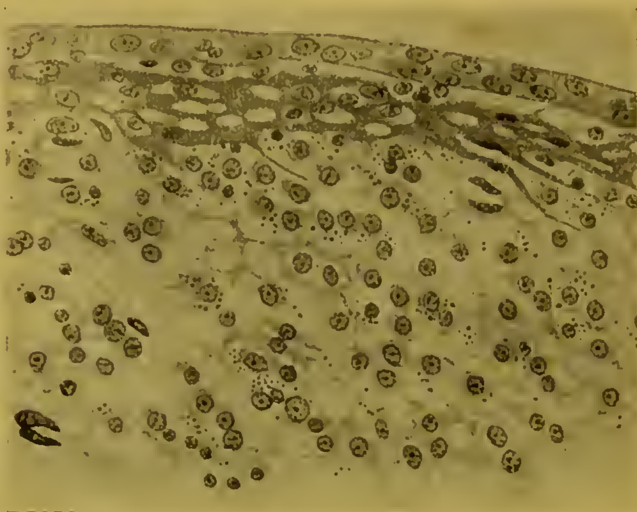


Fig. 555.

ha la completa scomparsa del tumore ed al sito ove esisteva il tumore primitivo non rimane che lo scheletro del tumore, cioè a dire la parte stromale e l'epitelio che ricopriva la neoformazione (fig. 556).

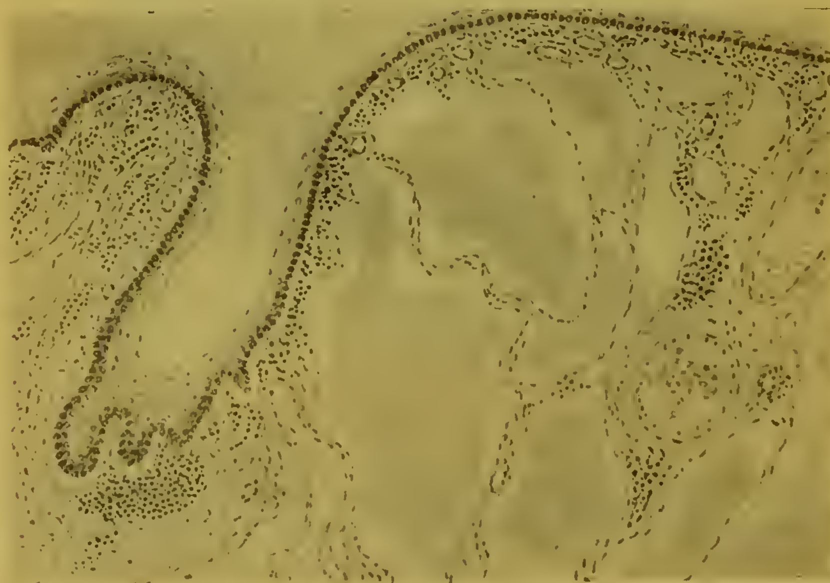


Fig. 556.

Il siero agisce solamente sugli elementi cellulari neoplastici specifici e non sulle parti del tumore che con la neoplasia non hanno nulla a che fare.

La regressione dei tumori epiteliali in seguito al trattamento specifico è alquanto diversa da quella che si osserva nei tumori sarcomatosi. Mentre

nel linfosarcoma prepuziale si ha la scomparsa totale della neoplasia, negli adenocarcinomi della mammella si ha la riduzione del tumore, ma non la

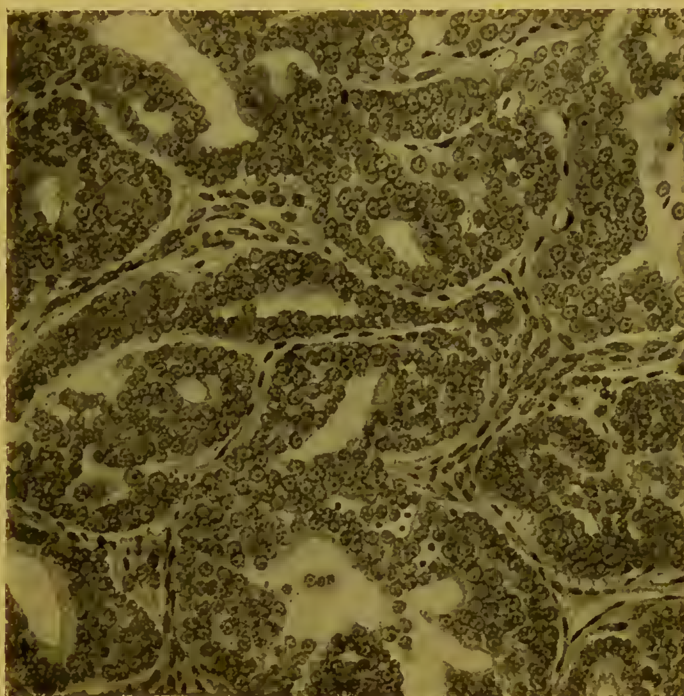


Fig. 557.

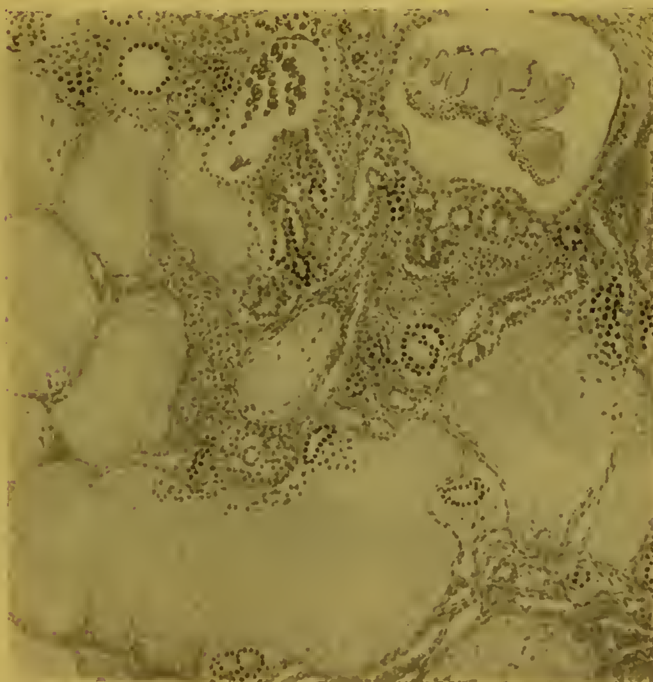


Fig. 558.

scomparsa e ciò dipende dal fatto che nella regressione dei carcinomi gli elementi neoplastici sono sostituiti da una sostanza di natura collagena che

l'organismo non può riassorbire. Si aggiunga inoltre che nei carcinomi la parte stromale è abbondante e rimane dopo la cura tale e quale senza potere essere riassorbita dall'organismo.

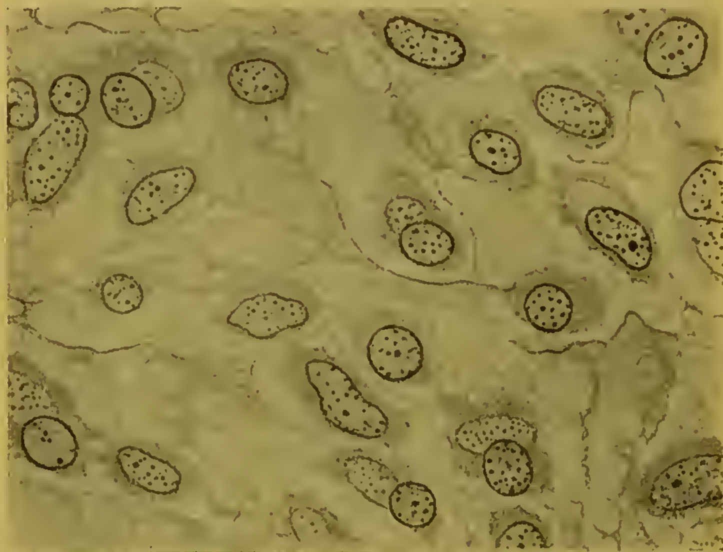


Fig. 559.

Nelle mammelle delle cagne si sviluppano degli adenocarcinomi, che per decorso e struttura non si differenziano molto da quelli che si osservano nelle mammelle delle donne (fig. 557).

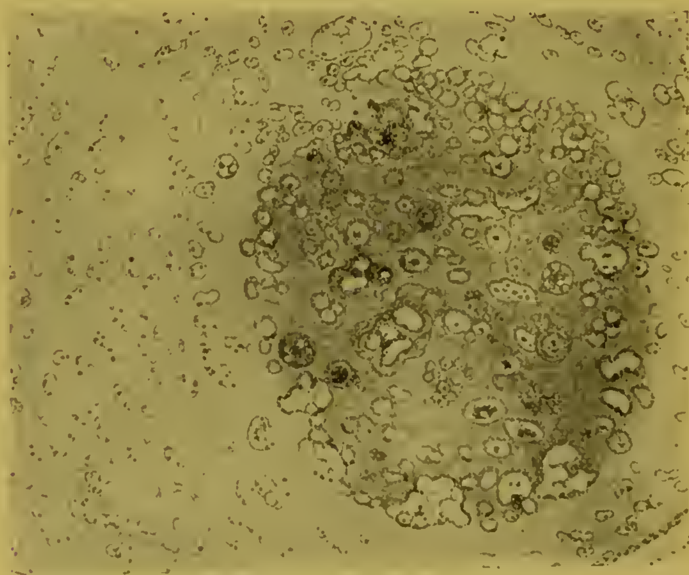


Fig. 560.

Qualche tempo dopo lo inizio della cura, se si pratica l'esame della neoplasia si osserva che in alcuni punti della neoplasia gli elementi neoplastici sono disorientati lasciando tra di loro dei vuoti che sono riempiti da una sostanza che si colora intensamente in bleu con la ematossilina e che è cer-

tamente di natura collagena (fig. 558). Guardando con forte ingrandimento uno di questi punti si osserva che la sostanza collagena si distende in forma di rete tra gli elementi epiteliali della neoplasia (fig. 559).

Procedendo la regressione del tumore si ha che la sostanza collagena sequestra come in tante nicchie gli elementi epiteliali neoplastici. In questo stadio della regressione il tumore prende l'aspetto di un tessuto cartilagineo (fig. 560).

Quando la regressione degli elementi epiteliali cancerigni è avvenuta in tutta la estensione del neoplasma si ha dal centro della neoplasia verso la periferia la incrostazione di sali calcarei.

È ben noto come gli adenocarcinomi delle mammelle delle cagne dànno spesso metastasi nei polmoni. Or bene quando si sottopone al trattamento sieroterapico una cagna che presenta adenocarcinoma della mammella con metastasi polmonali, si ha in un primo tempo la regressione delle metastasi polmonali ed in un secondo tempo la regressione del tumore primitivo.

In conclusione si può dire che il siero di sangue dei cani trattati con le colture in mezzi liquidi dei blastomiceti patogeni, contenenti parassiti morti e tossine, esercita azione dannosa sulle cellule neoplastiche cancerigne nello stesso modo che nelle cellule sarcomatose. Le cellule carcinomatose in seguito all'azione del siero si disorientano, in parte degenerano e sono riassorbite, in parte sono sequestrate dalla sostanza intercellulare cementizia che tende a riempire il vuoto lasciato dalle cellule epiteliali degenerate.

(Finito di stampare il 1° aprile 1912).

INDICE DELLA PARTE II DEL VOLUME I.

MICROSCOPIA APPLICATA ALL'IGIENE.

PARASSITOLOGIA.

PROTOZOOLOGIA.

BATTERIOLOGIA.

Batteriologia speciale:

b 50

1911-12


LONDON SCHOOL OF HYGIENE
LIBRARY
11 DEC 1958
TROPICAL MEDICINE

